Lane Medical Library
1935

Aus der Bayerischen Veterinärpolizeilichen Anstalt in Oberschleißheim.
(Vorstand: stellv. Direktor Dr. F. Lang).

Die Rauschbranddiagnose mit dem Verfahren nach Riedmüller.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Veterinärmedizinischen Fakultät

der

Hessischen Ludwigs-Universität zu Gießen

vorgelegt von

August Wiedemann

appr. Tierarzt aus Neuburg a. K.

Gießen 1935.

Aus der Bayerischen Veterinärpolizeilichen Anstalt in Oberschleißheim.
(Vorstand: stellv. Direktor Dr. F. Lang).

Die Rauschbranddiagnose mit dem Verfahren nach Riedmüller.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Veterinärmedizinischen Fakultät

der

Hessischen Ludwigs-Universität zu Gießen

vorgelegt von

August Wiedemann

appr. Tierarzt aus Neuburg a. K.

Gießen 1935.

Gedruckt mit Genehmigung
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Gießen.

Referent: Professor Dr. Zwick.

Druck: Buchdruckerei E. Rahn in Wunsiedel

Meinen lieben Eltern aus Dankbarkeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154009_0191

Disposition:

1. **Bisherige Verfahren zur Diagnose von Rauschbrand usw. (Schrifttum):**
   Plattenkulturen (Zeissler, Fortner).
   Deckglaskulturen (Fortner, Riedmüller).

2. **Nachprüfung des Riedmüller'schen Deckglasverfahrens.**
   Beschreibung des Verfahrens.

   I. **Versuch unter genauer Befolgung der Riedmüller'schen Technik.**

   II. **Versuche unter Aenderung des Ausgangsmaterials.**
      1. Trockenfleisch.
      2. Erhitztes Frisch- und Trockenfleisch.
      3. Reinkulturen. a) flüssige; b) feste; c) Ödemsaft vom Impftier.

   III. **Versuche unter Aenderungen am Nährboden.**
      1. Vermehrung des Agargehaltes.
      2. Aenderungen in der Menge der Zusätze zum Agar.
      3. Verwendung von Glutathion statt Zystein.
      4. Verwendung von älteren Nährböden.

   IV. **Versuche zur Verhinderung der Agaraustrocknung.**
      1. Abdichtung mit Paraffin, Wachs und Vaseline.
      2. Vergrösserung der Aussaatfläche.

V. **Abschliessender Versuch unter Verwertung der gewonnenen Beobachtungen.**

1. mit Frischfleisch;
2. mit Trockenfleisch;
3. mit reinen Kolonien aus Objektträgerdeckglaskulturen.
   a. Weiterführung von Reinkulturen aus Riedermülleragar in flüssige Nährböden.
   b. Weiterführung von Reinkulturen aus Riedmülleragar auf Blutplatten.
   c. Weiterführung von Reinkulturen aus Riedmulleragar auf ebensolchen.

3. **Zusammenfassung.**

SCHRIFTTUM.

Nach der Vollzugsbekanntmachung zum Reichsviehseuchengesetz vom 27. 4. 1912, (§ 20 der Anlage B, Ziff. III) ist zur sicheren Feststellung von Rauschbrand der Nachweis der Seuchenerreger notwendig.

Dieser Nachweis kann durch mikroskopische Prüfung, durch Anlegung von Kulturen oder durch Impfung geeigneter Versuchstiere geführt werden.

Da der Nachweis der Rauschbrandbazillen durch Mikroskopie allein niemals eindeutig genug ist zur „sicheren Feststellung" der Seuche, werden von den Untersuchungsstellen seit langem auch der Impfversuch und das Kulturverfahren zur Diagnose beigezogen; letzteres namentlich, seit Zeissler 1918 eine neue, brauchbare Methode zur Züchtung anaerober Keime in Oberflächenkultur bekannt gegeben hat.

Aber auch dieses Züchtungsverfahren hat in der Folge noch nicht restlos befriedigt, was die zahlreichen Versuche, es zu vervollkommnen und zugleich zu vereinfachen, beweisen.

Die Erfahrungen der Veterinärpolizeilichen Anstalt sowie die von ihr am Zeisslerverfahren vorgenommenen Änderungen sind in der Innaug.-Diss. von König (41) niedergelegt.

1928 hat Fortner (7) auf ein neues Verfahren — Züchtung mit Hilfe der Prodigiosusplatte — hingewiesen, das sich nach den Arbeiten von Aksjanzew-Malkin (1), Grimm (25), Neumann (48), Schreiber (58) und neuerdings auch von Mießner und Schoop (46) als dem Zeisslerverfahren ebenbürtig, in manchen Fällen sogar als überlegen erwiesen hat.

Letztere ziehen aus ihren Versuchen die gleiche praktische Schlußfolgerung wie die Anstalt und verwenden im Interesse einer möglichst schnellen und sicheren Diagnose beide Züchtungsverfahren nebeneinander.

Noch bessere Erfolge sowohl hinsichtlich der Weiterzüchtung als auch der Isolierung von Anaerobiern aus Untersuchungsmaterial will Koch (40) dadurch erzielt haben, daß er von Fortner die Einzelplatte beibehält, als Verschlußmittel für die Petrischalen jedoch Zeresin nimmt und die Sauerstoffverminderung mit trockenem Pottasche — Pyrogallol durchführt.

Die neuesten Verbesserungsversuche am Fortnerverfahren sind:

Bachmann (3) nimmt statt Bakt. prodigiosum Hefe — allein oder in Symbiose mit Staph. aureus — und Bakt. coli. Dabei will er eine Wirkungssteigerung durch Fließpapiereinlagen, die mit Natriumsulfit oder auch mit Ferrohydroxyd nach Hettche getränkt werden, festgestellt haben. Gute Erfolge hatte er auch mit einer erweiterten Anwendung des von Ritter und Dorner (55) empfohlenen Pyrogallol-Sodaverfahrens auf Blutplatten.

Die Erfahrung, daß die bloße Kolonieform allein zur genauen Differenzierung nicht immer ausreicht, drängte zu einer stärkeren Beiziehung des mikroskopischen Bildes der Kolonie. Diesem Zweck sollte die Mikroplattenmethode dienen. Fortner (11) benützt ein mit einem dünnen Häutchen von Levinthalager (43) überzogenes Deckgläschen, auf dem der Agar so zugeschnitten wird, daß er gerade in die Mulde eines hohlgeschliffenen Objektträgers paßt.

Das Deckglas wird mit dem Untersuchungsmaterial und ringsum mit Bakt. prodigiosum als Sauerstoffzehrer beimpft und auf den Objektträger mittels noch flüssiger Vaseline luftdicht aufgelegt. Die Herstellung einer solchen Deckglaskultur darf wegen der raschen Eintrocknung des Agarhäutchens nur etwa 5 Minuten beanspruchen. Die damit erreichten Wuchsformen entsprechen in verkleinertem Maßstabe völlig denen in der

Petrischale. Das Auskeimen, die Faden- und Sporenbildung, die Beweglichkeit, das Auftreten von Degenerationsformen, die Entstehung der verschiedenen Koloniestrukturen seien unter dem Mikroskop gut zu verfolgen und die Sporenkeimung bei Anaerobiern setze nach etwa 3—4 Stunden bei 37° ein. Geschlossene Kolonien seien nach etwa 1—2 Tagen dem unbewaffneten Auge eben sichtbar. Auch die Gewinnung von Subkulturen von einer solchen Mikrooberflächenkultur bereite keine Schwierigkeiten.

Mit dieser Mikroplattenmethode und der Makroplattenmethode hat Wakamatsu (64) nun Vergleichsversuche angestellt, wobei sich ergab, daß die Anschlagshöhe bei der Mikrokultur wegen der zu kleinen Impffläche niedriger ist als bei Fortners Makroplattenkultur. Das Verfahren scheidet also damit für die praktische Rauschbranddiagnose aus. Ebenfalls lediglich wissenschaftliches Interesse verdienen die Mikrokulturversuche von Neumann (48), der u. a. auf die mit Untersuchungsmaterial und mit Bakt. prodigiosum zart bestrichene Agarschicht direkt ein Deckglas legt. Dieses Züchtungsverfahren verwendet er später auch, um die Entwicklung isolierter Anaerobiersporen in ihren einzelnen Phasen unterm Mikroskop photographisch festzuhalten. Ähnlich wie Fortner (11) arbeiteten Dimitrijević-Speth und Vera Kitschevaz (5), jedoch nur mit flüssigen Mikrokulturen.

Nunmehr hat auch Riedmüller (53) „ein einfaches Mikroplattenverfahren für die Gasbranddiagnostik" veröffentlicht. Es fußt auf der nach Zeissler (68) von anderen Autoren bereits gemachten Beobachtung, daß ein Zusatz von organischen oder anorganischen, reduzierenden Substanzen im Nährsubstrat zur chemischen Reduktion des Sauerstoffes führt.

Den Grundstock zu diesem Verfahren bildeten frühere Arbeiten von Frei und Riedmüller (19, 20) über die Reduktionsfähigkeit von Zystein [unabhängig von Hosoya (31), Quastel (51), Stephenson und Wetham (50)], Glutathion, Thioglykolsäure, Dithioglykolsäure, Thioessigsäure, Glutamin-

säure, Bernsteinsäure, Fumarsäure und Xanthin. Dabei fanden sie, daß für Rauschbrand Glutathion bei gleichen Konzentrationen dem Zystein nachstand. Glutathion gibt in oxydierter Form keine Fällungen oder Trübungen wie Zystein. Auch in Glutaminsäurehochagar wuchs der sonst so heikle Rauschbrand ganz gut. Dithioglykolsäure war nur ausnahmsweise wachstumsfördernd.

Frei und Hall (18) haben das Zysteinhydrochlorid bei 80° dem Agar zugesetzt. Frei und Riedmüller empfehlen in ihrer ersten Arbeit 70°. Als maßgebend wurden ferner für die Gewinnung von Rauschbrandkulturen ein Zusatz von Traubenzucker zum Agar, ein pH-Gehalt von 7,4—7,7 und die Bedeckung der Agaroberfläche mit einem Deckglas erkannt.

Im Laufe der Versuche wurde beobachtet, daß bei Pararauschbrand ohne erkennbaren Grund außer den meist erhaltenen flockigen Kolonien mit Ausläufern („gelockerter Typus") im festen Zysteinnährboden auch geschlossene rauschbrandähnliche Kolonien vorkamen. Als Erklärung hiefür wurde eine Verschlechterung der Lebensbedingungen (Sauerstoffzutritt?) angenommen.

Die den Sauerstoff beseitigende Eigenschaft des Zysteins, einer Schwefelverbindung, beruht darauf, daß es als Wasserstoff abgebende Substanz gleichzeitig Sauerstoffverbraucher ist und dadurch z. B. im Agar anaerobe Bedingungen schafft. Als auslösender Faktor für die Abgabe von Wasserstoff („Dehydrase") wirken kleine Spuren von Metall (z. B. Fe). Allenfalls von außen noch hinzutretender Sauerstoff wird bei genügendem Zysteingehalt weiterhin unschädlich gemacht [Frei (16) und Riedmüller (19), Frey und Riedmüller (20), Hall (18)].

Daß Schwefel enthaltende Stoffe auf das Wachstum der Anaerobier ebenso günstig wirken wie die üblicherweise zum Nährmedium beigegebenen Organstücke hat schon Kishins, Shigaki (35) gefunden und Hosoya (31) hat bereits 1926 eine Zystinbouillon vorgeschlagen.

Da nach Plotz (49) Traubenzucker besonders in Verbin-

dung mit Natronlauge, die zum Alkalisieren des Nährbodens verwendet wird, ein ganz erheblich gesteigertes Reduktionsvermögen aufweist, so enthält der Riedmüller'sche Nährboden die für das Anaerobenwachstum besonders geeigneten Zusätze.

Zur Verzögerung der durch Autoxydation entstehenden Zystinausfällungen gibt Riedmüller als Zusatz zum Zysteinagar noch Thiodiglykolsäure. Der Ausgangsagarnährboden könne in jeweils praktisch günstigen Mengen vorrätig gehalten werden, was eine große Vereinfachung und zugleich Ersparung gegenüber dem ständigen Bereithalten von Blutplatten bei den bisherigen Makroverfahren bedeute. Die zur Anaerobiose nötigen Zusätze werden erst im Bedarfsfalle zugegeben, da der Zysteinagar nur ca. 6—8 Tage haltbar sei. In einer Stunde könne der Nährboden gebrauchsfähig sein und besondere Apparaturen seien nicht notwendig. Die Züchtungsmethode ist folgende:

Ein gereinigtes und abgeflammtes Deckgläschen wird mit Untersuchungsmaterial bestrichen, mit noch flüssigem Zysteinagar betropft und sofort mit einem zweiten Deckglas bedeckt und ist damit fertig zur Bebrütung. Schon nach 2—3 Stunden könne man Rauschbrand- und Pararauschbrandsporen auskeimen und nach ca. 5—6 Stunden die beginnende Koloniebildung sehen. Während bei Pararauschbrand die Ausdehnungstendenz der anfänglich kurzen Ketten zunehme, bilden sich beim Rauschbrand anfänglich seltener kurze Ketten. Dann aber folge rasch ein Aneinanderlagern, so daß nach 12—16stündiger Bebrütung bei Rauschbrand runde geschlossene Kolonien, bei malignem Ödem dagegen flockige Formen mit zahlreichen Ausläufern in Erscheinung treten. Wichtig für die Diagnose sei die frühzeitige Sporenbildung sowohl beim Rauschbrand als auch beim Pararauschbrand schon in der 12.—16. Stunde im Gegensatz zu vielen zu Verwechslung Anlaß gebenden aeroben und anaeroben Sporenbildnern. Nach 24—48 Stunden seien die bekannten Blähformen da. Die einzelnen Kolonien lägen oft in kleinen Gasblasen. Aerobe Ver-

unreinigungskeime stören das Wachstum der Anaerobierkolonien nicht und seien gut von diesen zu unterscheiden. Bei stark verunreinigtem, sporenhaltigem Muskelmaterial müsse der Muskelsaft vor der Verimpfung 20 Minuten auf 80° erhitzt werden. Ein Versagen der Methode habe er niemals feststellen können. Da der Agar während der Bebrütung ziemlich trocken werde und das Kondenswasser seitlich verdunsten könne, sei ein Verlaufen der Kolonien nicht so wie bei Plattenaussaaten zu befürchten. Einzelnstehende Kolonien können nach Abheben des Deckglases auch mikroskopisch auf Reinheit geprüft werden.

Das Verfahren habe den Vorteil, daß bei wenig Zeit- und Materialaufwand in 12—24 Stunden diagnostisch verwertbare Kolonieformen vorhanden seien, wobei gleichzeitig die Form der Einzelstäbchen sowie die Sporenbildung zur Beurteilung mit herangezogen werden könne. Mischinfektionen erkenne man leicht. Dank der konstanten Wachstumsbedingungen seien die Variationen der Kolonieformen keinesfalls größer als bei Oberflächenkulturen.

Der Vollständigkeit halber seien noch die neuesten Versuche einfacher Anaerobiose angeführt. Scott und Brandly (59) setzen reduziertes Eisen zu flüssigen oder festen Nährböden und bekommen so ohne weiteres Anaerobenkulturen. d'Antona (2) nimmt Ferrum porphyrisatum purum Kahlbaum, dessen Reduktionswirkung er durch Zugabe von Glukose (1%) steigert.

Die Aussicht, bei Anwendung des Riedmüller'schen Verfahrens außer der Form der Kolonien auch gleichzeitig noch deren mikroskopischen Aufbau zur Differenzierung zwischen Rauschbrand und Pararauschbrand beiziehen zu können, bestimmten die Anstalt, dieses Verfahren unter den Bedingungen der bakteriologischen Praxis auf seine Verwendbarkeit bei der Rauschbranddiagnose besonders im Hinblick auf Fälle anaerober Mischinfektion hin prüfen zu lassen und zwar unter besonderer Berücksichtigung von dessen Einfachheit, Billigkeit, Raschheit und Zuverlässigkeit.

EIGENE VERSUCHE.

Im Interesse einer klaren Übersicht der späteren Versuchsanordnung sollen die Angaben über das Ausgangsmaterial, die bisherige Züchtung der Anaerobier, die Gewinnung und Züchtung von Reinkulturen und die Herstellung des Zysteinagars und die Technik für die Mikrokultur nach Riedmüller vorweggenommen werden.

DAS UNTERSUCHUNGSAUSGANGSMATERIAL.

Zu meinen Versuchen wurde Ausgangsmaterial verwendet, das 142 mal Rauschbrand, 124 mal Pararauschbrand und 4 mal beide Anaerobierarten zugleich enthielt. Es bestand aus:

84 Trockenfleischproben vom Rind [43 Rauschbrand (= R) und 41 Pararauschbrand (= PR)], die von Einsendungen an die Anstalt in den Jahren 1932 mit 1934 stammten;

23 Frischfleischproben vom Rind [8 R und 11 PR sowie 4 R + PR (= Mischinfektionen)];

30 Frischfleischproben von Meerschweinchen (19 R und 11 PR);

63 nach den Methoden Zeissler oder Fortner gewonnenen Reinkulturen, davon 33 flüssige (22 R und 11 PR) und 30 feste (13 R und 17 PR) und

70 im Laufe der Versuche aus Mikrokulturen nach Riedmüller gewonnene Reinkulturen (37 R und 33 PR).

Mit diesem Ausgangsmaterial (270) wurden insgesamt 925 Anzüchtungen getätigt und zwar 827 lediglich zur Anlage von Deckglaskulturen nach Riedmüller, 84 zur Züchtung von Blutplattenkulturen (26 nach Zeissler und 58 nach Fortner) und 14 zur Gewinnung von flüssigen Reinkulturen.

Trockenfleisch wurde wie folgt vorbehandelt: Jeweils 1 Würfel von ca. 1 cm Seitenlänge wurde 10 Minuten lang in 96% Alkohol gelegt, alsdann abgebrannt und im sterilen Mörser völlig zu Pulver verrieben. Mittels steriler Bouillon wurde ein dünner Brei angerührt und durch ein ausgeglühtes Kupferdrahtsieb von $^1/_2$ mm Maschenweite geseiht. Von diesem Filtrat

wurde jeweils ein mikroskopisches Präparat gefertigt zur Ermittlung, ob und wie viele anaerobe und allenfalls auch aerobe Keime vorhanden waren, weil sich danach dann die Menge des Aussaatmaterials richtete.

Bei mäßigem Gehalt an Begleitbakterien, aber reichlichem Vorhandensein anaerober Keime bedurfte es lediglich einer oder mehrerer Verdünnungen bei der Aussaat, um Störungen des anaeroben Wachstums hintanzuhalten. Bei sehr starker aerober Verunreinigung wurde das sporenhaltige Filtrat vor der Züchtung in einem Reagenzglas entweder 10 Minuten lang im Wasserbad unter öfterem Umschütteln auf 70° C oder nach Riedmüller 20 Minuten auf 80° C erhitzt.

Frischfleisch wurde (für das Zeisslerverfahren) ähnlich vorbereitet wie Trockenfleisch. Sporenfreies, aber aerob stark verunreinigtes Frischfleischfiltrat, wurde zur Aussaat in fallenden Mengen verwendet.

Im einzelnen wurden folgende Züchtungsverfahren angewandt.

ZÜCHTUNG NACH ZEISSLER.

Verflüssigter Traubenzucker (2%) — Agar (4%) wird mit frischem Hammelblut (25%) versetzt und in gewöhnliche Petrischalen ausgegossen. Das Untersuchungsmaterial wird zwecks Herstellung von Verdünnungen auf jeweils 3 Impfstriche verteilt.

Die Bebrütung erfolgt im Anaerobenapparat nach Zeissler (69) (Begerow, Altona) ohne sonstige Zusätze nach Evakuierung mittels der Pfeiffer'schen einstufigen Ölpumpe 36—48 Stunden lang.

ZÜCHTUNG NACH FORTNER.

Hammelblut (10 %) — Agar (4%) wird in nur 1 cm hohe Petrischalen ausgegossen. Die Platten werden auf der einen Hälfte mit einer $^1/_2$—1 mm dicken Schicht einer nicht zu alten, gutgewachsenen Prodigiosuskultur, auf der anderen Hälfte mit

dem zu untersuchenden Material je nach Keimgehalt gitterförmig oder flächenförmig beimpft. Als Deckel dient eine 2 mm dicke, vorher gut abgeflammte Glasplatte; als Verschluß Plastilin. Außerdem wurden auch Zeisslernährböden der Züchtungsmethode nach Fortner unterworfen. Die Bebrütungszeit betrug nicht über 24 Stunden bei Pararauschbrandkulturen bezw. bis zu 36 und vereinzelt auch 48 Stunden bei Rauschbrandkulturen.

Die Musterung der auf den Blutagarplatten gewachsenen Oberflächenkulturen erfolgte mit dem binokulären Plattenmikroskop von Zeiss-Jena bei meist 15facher Vergrößerung.

Isoliert gelegene Kolonien vom Aussehen der Rauschbrand- oder Pararauschbrandwuchsform wurden mit der Platinöse abgetupft und auf einem vorher gereinigten Objektträger verstrichen. Nach Zugabe eines kleinen Tropfens von Löffler'schem Methylenblau wird ein Deckglas aufgelegt.

Die Feststellung und Unterscheidung von Rauschbrand und Pararauschbrand geschah durch Bestimmung der Kolonieform und durch Prüfung derselben im Nativpräparat mittels Ölimmersion nach den von Zeissler festgelegten und von König (41) und Schreiber (58) erweiterten Richtlinien.

Stand nach dieser Musterung die Reinheit der anaeroben Kolonie fest, so wurde die gleiche oder eine andere einwandfreie Kolonie gleichen Aussehens abgestochen und entweder auf feste oder in flüssige Nährböden verbracht.

ZÜCHTUNG NACH RIEDMÜLLER.

Nährbodenbereitung.

Der Ausgangsnährboden nach Riedmüller wurde hergestellt aus Rind- oder Pferdefleischbouillon und $2^1/_2\%$ Pulveragar und nach $^3/_4$stündiger Erhitzung bei 110^0 sowie Einstellung auf p H 7,4 und Filtration in Kölbchen zu 50 oder 100 ccm vorrätig gehalten.

Dieser Ausgangsagar wird von Fall zu Fall im Dampftopf flüssig gemacht und dann mit

0,3% Zysteinchlorhydrat (Hoffmann, La Roche, Basel) und ferner zur Verzögerung der Zystinausfällung mit

0,5% Thiodiglykolsäure (Gesellschaft für chem. Industrie, Basel)

versetzt. Nun wird mit 10%iger Natronlauge nochmals auf p H 7,4 eingestellt und 1% Traubenzucker zugegeben. Dieser Zysteinagar wird zu 10 ccm in Röhrchen abgefüllt und nochmals $^1/_2$ Stunde in strömendem Dampf sterilisiert. (Längeres Erhitzen beeinträchtigt die Güte des Nährbodens). Der in Reagenzgläsern abgefüllte Zysteinagar ist ca. 6—8 Tage haltbar. Nach 3—4 Tagen sieht man an der Oberfläche weißliche Kristalle auftreten, welche unschwer als durch Autoxydation entstandene Zystinausfällungen zu erkennen sind.

Anlage der Kulturen.

Nach Riedmüller werden in eine sterile Petrischale 3 mit Ätheralkohol gereinigte und durch die Flamme gezogene Deckgläschen (24 × 32 mm) mit steriler Kühne'scher Pinzette nebeneinandergelegt. Weitere sterile Deckgläschen liegen in einer zweiten Petrischale bereit. Ein Röhrchen Zysteinagar wird im Wasserbad verflüssigt und auf 50° abgekühlt. Von dem zu untersuchenden abgeflammten Frischfleisch wird aus einer frischen Schnittfläche mit veränderten Stellen ein orientierendes Abklatschpräparat gefertigt. Werden darin Stäbchen und Sporen ohne stärkere Verunreinigung gefunden, so führt man unmittelbar in der Nähe der untersuchten Schnittfläche mit sterilen Instrumenten einen zweiten Schnitt aus und entnimmt hievon mit der Öse etwas Muskelsaft, der auf die in der womöglich angewärmten Petrischale bereitgehaltenen sterilen 3 Deckgläschen nacheinander so ausgestrichen wird, daß man 3 verschiedene Verdünnungen erhält. Nun nimmt man den flüssigen Zysteinagar aus dem Wasserbad, gießt davon auf jedes beimpfte Deckgläschen ca 3—5 Tropfen und legt rasch ein zweites in der anderen Petrischale vorrätig gehaltenes steriles Deckgläschen auf. Dabei soll sich der Agar gleichmäßig zwischen den beiden Deckgläschen verteilen, ohne auf die Petrischale abzulaufen.

Die Bebrütung dieser Deckglaskulturen erfolgt bei 37° in der Petrischale.

Zur Beobachtung des Wachstums nimmt man die Deckglaskulturen mit der Kühne'schen Pinzette aus der Petrischale und legt sie zur Untersuchung unter dem Mikroskop mit der beimpften Seite nach oben auf einen Objektträger. Künstliches, entsprechend abgeblendetes Licht, schwaches Objektiv und ev. Objektivzwischenstück mit Irisblende sowie starkes Okular sind am geeignetsten.

Zunächst galt es nun das Verfahren unter engster Anlehnung an diesen von Riedmüller veröffentlichten Gang kennen zu lernen.

I. Versuch unter genauer Befolgung der Riedmüller'schen Technik.

Ausgangsmaterial: 16 Frischfleischproben (6 R und 7 PR) sowie 3 Fleischstücke mit Mischinfektion (R + PR).

Von diesem Material wurden nach der Riedmüller'schen Originalmethode einschließlich der Wiederholungen insgesamt 69 Deckglaskulturen angelegt. Die Menge des angezüchteten Materials betrug entsprechend dem zufällig nahezu gleichen anaeroben Keimgehalt in allen Proben jeweils 1 Öse von etwa 2 mm Weite.

Zur Kontrolle dienten 48 Blutplatten und zwar 16 nach Fortner und 32 nach Zeissler.

Da Riedmüller diagnostisch verwertbare Kolonieformen nicht vor 12 Stunden auftreten sah, begann ich die Beobachtung der Kulturen auch nicht vorher. Das Wachstum der Kulturen wurde aber weiterhin noch nach 24, 36 und 48 Stunden beobachtet.

Ergebnis:

Die Rauschbrandkulturen.

Rauschbrandkolonien waren in den Riedmüllerkulturen auf das erste Anzüchten hin nur 6mal aufgegangen, wobei in der

Regel eine mehr oder minder starke Zerreißung des Agars zu beobachten war. Bei den übrigen 3 gleichzeitig angelegten ohne ersichtlichen Grund aber nicht gewachsenen Kulturen führte eine Wiederholung zum Ziel. Hiezu ist zu bemerken, daß in einem Fall auch mittels Züchtung nach Zeissler kein anaerobes Wachstum erzielt wurde. Im übrigen war bei dem Verfahren nach Riedmüller nahezu die gleiche Menge Kolonien angegangen wie bei den Kontrollen; in 2 Fällen überwog das Fortner-Verfahren.

Die in der Regel farblosen Kolonien waren nach 12 Stunden Brutschrankaufenthalt meist rund, geschlossen und von wechselnder Größe. Bisweilen traten auch rundlich-eckige Kolonien daneben auf.

Mit der Ölimmersion fand man meist enganeinandergelagerte, oft zum großen Teil geblähte Stäbchen, mitunter fertige Blähformen (Zitronen, Kugeln, Splitter) und manchmal auch beginnende Versporung.

Nach 24stündiger Bebrütung bot sich das gleiche Bild. Nur ganz selten hatten eckig-rundliche Kolonien sich mehr gerundet oder kleinere Kolonien an Größe etwas zugenommen. Vereinzelt sah man auch noch ganz kleine Kolonien (nachgewachsen?), so daß die Beobachtung von Neumann (48), daß gleichzeitig angezüchtete Keime nach verschiedener Zeit angehen, zuzutreffen scheint.

Mikroskopisch überwogen in der Mehrzahl die Blähformen. Sporulation fehlte selten, war aber noch seltener stark. Anscheinend mit Zunahme der Blähformen nahmen manchmal die Kolonien leichte Eigenfarbe an. Auch in Gasblasen liegende Kolonien konnte man nun beobachten. Die Ausdehnung der Agarzerreißung blieb in der Regel gleich; nur begann vom Rande her leichte Nährbodeneintrocknung. Beim Fehlen von Kolonien fehlte stets auch die Agarzerreißung und die Eintrocknung des Agars vom Rande her war wesentlich schwächer.

Nach 36stündigem Brutschrankaufenthalt war ein weiteres Wachstum der Kolonien nicht mehr zu beobachten; die Ein-

trocknung war aber fortgeschritten. Im uneingetrockneten Agar liegende Kolonien wiesen nun meist deutliche bis starke Versporung auf. Die Blähformen (Trümmer, Brocken, Ecken, Splitter etc.) waren prall, wie zum Platzen gespannt; Stäbchen waren kaum mehr anzutreffen, höchstens noch geblähte.

Nach 48 Stunden waren die Kolonien nur noch schlecht aufzufinden. Schuld daran dürfte die weiter fortgeschrittene Eintrocknung und die damit verbundene Schrumpfung der Blähformen gewesen sein. Diese glichen oft Detritusmassen. Deutlich sichtbar waren lediglich noch die Sporen.

Die Pararauschbrandkulturen.

Pararauschbrandkolonien gingen in allen Fällen und gleich zahlreich wie bei den Kontrollversuchen auf. Die Agarzerreißung fehlte nie und war eher stärker als bei den Rauschbrandkulturen.

Nach 12stündiger Bebrütung begegnete man im großen und ganzen den gleichen Wuchsformen wie bei den Makroplatten, nur waren sie entsprechend kleiner. Ein Fall lieferte auch die differentialdiagnostisch schwierigen, rauschbrandähnlichen Rundkolonien. Frei und Riedmüller (19) führen diese Erscheinung auf Verschlechterung der Lebensbedingungen zurück.

Mikroskopisch überwogen — besonders in den Ausläufern — Stäbchen, die aber meist schlanker und länger waren als beim Rauschbrand und sogar Ketten bildeten. Im Innern der Kolonien konnte man außer Stäbchen und Blähformen (Schläuche, Feldflaschen, Zitronen) deutliche bis starke Sporulation erkennen. Die Bazillen in den rauschbrandähnlichen Rundkolonien waren dichter gelagert und schienen in der Entwicklung vom Stäbchen über die Blähformen zur Spore vorgeschrittener zu sein, wofür ihre meist stärkere Versporung sprach. Oft wiesen die Pararauschbrandkolonien starke, seltener nur schwache Eigenfarbe auf.

Nach 24 Stunden waren die viel häufiger als beim Rauschbrand durch Weiterwachsen verursachten Änderungen der Ko-

lonieform auffallend. Besonders wichtig erschien dies dann, wenn seit der ersten Beobachtung aus den rundlich-eckigen Kolonien Zapfen und Spitzen gesproßt waren. Neben zahlreichen Stäbchen und Blähstäbchen waren bereits massenhaft längliche und kugelige Blähformen zu finden, außerdem meist starke, mitunter sehr starke Versporung. Die nach 12 Stunden in einem Falle festgestellten atypischen Rundkolonien waren nahezu gleich geblieben; es hatten sich aber auch die typischen Kolonien des gleichen Falles kaum geändert. Verstärkung der Eigenfarbe wurde bisweilen beobachtet. Die Agarzerreißung nahm selten zu, meist setzte schon die Eintrocknung ein.

Nach 36 Stunden nahmen die Blähformen und die Versporung fast durchwegs zu. Die Eintrocknung hielt damit gleichen Schritt. 48stündige Pararauschbrandkolonien waren zwar noch deutlicher als gleich alte Rauschbrandkolonien, litten aber ebenso unter starker Eintrocknung, so daß nur noch die Umrisse der Kolonien und ihr durchweg sehr starker Sporengehalt erkennbar war.

Die Mischkulturen.

Das mit Rauschbrand und Pararauschbrand infizierte Material lieferte — wie auch die Kontrollplatten — Kolonien beider Erreger. Dabei ermöglichte schon die Form der Kolonien eine Trennung der beiden Anaerobierarten. Weitere und feinere Unterschiede ergaben sich unter der Ölimmersion. Insbesondere ermöglichte die frühzeitige und starke Versporung bei Pararauschbrand eine deutliche Abtrennung von dem meist später und in der Regel dabei weniger stark versporenden Rauschbrand.

Somit ergaben diese ersten Versuche, daß aus frischem Muskelfleisch mit dem Deckglasverfahren nach Riedmüller Rauschbrand- und Pararauschbrandkulturen gewonnen werden können. Für die Trennung beider ist die Form der Kolonien maßgebend. Der Rauschbrandbazillus wächst in der Regel rund und geschlossen; der Pararauschbrandbazillus zeigt die vom Plattenverfahren her bekannten Formen. Auch Fälle von Misch-

infektion können erkannt werden. Allerdings kommen die vom Plattenverfahren her bekannten diagnostisch zweifelhaften Kolonien (Rundkolonien bei Pararauschbrand und rundlich-eckige Kolonien bei Rauschbrand) auch beim Riedmüller'schen Verfahren vor. Dafür kann aber außer der Form der Kolonie an Ort und Stelle gleichzeitig auch deren Zusammensetzung (Stäbchen, Blähstäbchen, Blähformen und Sporen) festgestellt und differentialdiagnostisch verwertet werden. Die frühzeitige starke Versporung der Pararauschbrandkolonien und die etwas deutlichere Eigenfarbe sind nicht zu unterschätzende Unterscheidungsmerkmale gegenüber den Rauschbrandkolonien. Aerobe Kolonien und Mischkolonien lassen sich unter der Ölimmersion ausscheiden.

Da nach 24stündigem Brutschrankaufenthalt Wachstum kaum mehr zu beobachten ist und bereits die Eintrocknung beginnt, dürfte diese Bebrütungsdauer genügen. Agarzerreißung bildet einen augenscheinlichen Hinweis auf Wachstum, kann aber bei schwachem Wachstum auch ausbleiben.

Als Nachteil fällt die geringe Anschlagshöhe bei der ersten Anzüchtung gegenüber den Kontrollen auf.

Weiterhin führte dieser Versuch noch zu der Beobachtung, daß der Alkalitätsgrad des Agars genau nachgeprüft werden muß, da Nachsäurungen vorkommen, ohne daß der Grund hiefür zu ermitteln ist, und daß die Beimengung der Zusätze besser bei einer Agartemperatur unter 70° als darüber vorgenommen wird.

Unter Berücksichtigung dieser Erfahrungen wurden nun weitere Versuche angestellt und dabei anderes Ausgangsmaterial verwendet.

II. Versuche unter Änderung des Ausgangsmaterials.

1. Trockenfleisch.

Der Ausgangsagar wurde in kleinen Mengen (10 ccm) vorrätig gehalten; die Vermischung mit den nötigen Zusätzen erfolgte unter Schütteln in dem mit einem vorher ausgekochten Kork verschlossenen Agarröhrchen.

Ferner wurde zur möglichsten Hintanhaltung der Eintrocknung die Agarmenge bei den Deckglaskulturen gegenüber Riedmüller's Angaben etwas vermehrt und statt einem zweiten Deckglas ein sterller Objektträger verwendet.

Damit vollzog sich die Herstellung der Deckglasobjektträgerkultur folgendermaßen:

Ausstreichen des Ausgangsmaterials auf einem Deckgläschen, Beschickung eines sterilen Objektträgers (Mitte!) mit Zysteinagar, Auflegen des nunmehr umgedrehten beimpften Deckglases auf den Objektträger. Der an den Rändern entstehende Agarwulst bildete so einen gewissen Schutz gegen zu frühe Eintrocknung und die Kultur war handlich wie jedes andere mikroskopische Präparat.

Weil die dritte und nicht selten auch die zweite Verdünnung öfters versagte die erste Aussaat dagegen meist brauchbare Züchtungsergebnisse lieferte wurde in den weiteren Versuchen jeweils nur mehr eine Deckglaskultur angelegt.

Ausgangsmaterial: 22 aus früherem Untersuchungsmaterial der Anstalt stammende Trockenfleischproben (11 R und 11 PR). Zur Kontrolle diente der gleiche Nährboden mit Kulturen aus 4 Frischfleischproben und zwar 2 mal Einsendungsmaterial (1 R und 1 PR) sowie 2 mal Muskelsaft von Impftieren (1 R und 1 PR). Mit diesem Material wurden einschließlich der Kontrollen insgesamt 36 Objektträgerdeckglaskulturen angelegt. Die Menge des Aussaatmaterials betrug je nach seinem anaeroben Keimgehalt jeweils $^1/_3$—$^1/_2$—1 Öse.

Beobachtung: Nach 12, 24, 36 und 48 Stunden.

Ergebnis:

Die Rauschbrandkulturen.

Von den 11 Rauschbrandfällen gingen 8 bei der ersten, 2 bei der zweiten und 1 Fall erst bei der dritten Anzüchtung an; die Kontrollen aus Frischfleisch dagegen jedesmal sofort. Eine Zerreißung des Agars fehlte trotz Wachstum nach 12 Stun-

nen dreimal, nach 24 Stunden nur mehr einmal. Die Eintrockdung war dank der größeren Nährbodenmenge geringer als beim 1. Versuch.

Nach 12stündiger Bebrütung traten bei 2 Fällen außer den typischen, runden auch atypische ovale-birnförmige und in einem Fall rundlich-eckige, leicht zipflige Kolonieformen auf.

Die Zusammensetzung (Stäbchen, Blähformen) derselben sowie die verzögerte Versporung waren jedoch typisch für Rauschbrand.

Für die Diagnose auf Grund der Kolonieform allein genügte wie im 1. Versuch bereits eine 24stündige Beobachtung, da Änderungen nachher nicht mehr auftraten.

In allen Fällen waren Sporen nach 36 Stunden einwandfrei festzustellen und damit war die Ausdehnung der Beobachtungszeit auf 36 Stunden notwendig.

Die übrigen Beobachtungen deckten sich mit denen des 1. Versuches.

Die Pararauschbrandkulturen.

Nur in einem von 11 Fällen war die Erstanzüchtung ergebnislos und eine Wiederholung nötig. Die Kontrollen gingen jeweils sofort an. Agarzerreißung und Eintrocknung traten frühzeitig stärker auf als bei Rauschbrand; Eigenfarbe der Kolonien fehlte selten.

Außer typischen Pararauschbrandkolonien waren 2mal auch atypische, rauschbrandähnliche Kolonien anzutreffen, die sich aber in einem Fall nach 24 Stunden in typische umgewandelt hatten. Diese Beobachtung spricht dafür, daß bei Pararauschbrand noch bis zu 24 Stunden Wachstum vorhanden sein kann. Im anderen Falle ließ neben der Eigenfarbe die schon nach 24 Stunden sehr starke Versporung keinen Zweifel daran, daß Pararauschbrand vorlag. Bei der Wiederholung der Kultur mit dem gleichen Ausgangsmaterial blieben diese atypischen Kolonieformen aus. Die Beobachtung nach 36 und 48 Stunden ergab nichts Neues.

Zusammenfassend zeigt der Versuch, daß auch aus Trocken-

fleisch mit der Riedmüller-Methode Rauschbrand- und Pararauschbrandkolonien gezüchtet werden können. Beim Rauschbrand und beim Pararauschbrand kamen atypische Kolonieformen vor, die jedoch als solche aus dem bazillären Aufbau erkannt werden können. Der Ersatz des einen Deckglases durch einen Objektträger und größere Agarmenge zur Verzögerung der Eintrocknung haben sich bewährt.

Die aus dem Trockenfleisch ermittelten Erreger entsprachen den bereits früher an der Anstalt erhobenen Befunden, jedoch war die Anschlagshöhe damals aus Frischfleisch auf den Blutplatten größer.

2. Erhitztes Frisch- und Trockenfleisch.

Im Sommer eingeschicktes Frischfleisch ist häufig mit anderen Keimen sehr stark verunreinigt und erschwert die bakteriologische Diagnose. Das gleiche kann bei Trockenfleisch vorkommen. In solchen Fällen wurde an der Veterinärpolizeilichen Anstalt bisher die aus dem Ausgangsmaterial hergestellte Aufschwemmung 10 Minuten lang in einem Wasserbad von 70° C erhitzt. Riedmüller schreibt eine Erhitzung von 20 Minuten bei 80° C vor.

Die nächsten Kulturversuche erfolgten daher aus 4 Frischfleischproben (2 R und 2 PR) und 2 Trockenfleischproben (1 R und 1 PR), nach vorheriger Erhitzung auf 80 bezw. 70° C.

Als Kontrollen dienten Kulturen aus der gleichen, nicht erhitzten Aufschwemmung auf gleichem Nährboden. Außerdem wurden 2 auf 80° C erhitzte Frischfleischproben (1 R und 1 PR) auch auf der Fortnerblutplatte geprüft.

Sämtliche Deckglaskulturen wurden wiederum nach 12, 24, 36 und 48 Stunden beobachtet.

Einschließlich der Kontrollen wurden 16 Objektträgerdeckglaskulturen gefertigt; zum Fortner-Verfahren wurden lediglich 2 Blutplatten benötigt.

Die Menge des Impfmaterials betrug 2 Ösen.

Ergebnis: Rauschbrandkulturen gingen stets an. Die Er-

hitzung auf 80° C wirkte aber schädigender als die auf 70°, was sich aus der Zahl der Kolonien im Verhältnis zu denen der unerhitzten Kontrollen ergab. Beim Pararauschbrand versagte ein Frischfleisch bei beiden Erhitzungsarten (unreife Sporen?), nicht aber bei den Kontrollen.

Bei einem Pararauschbrandtrockenfleisch traten rauschbrandähnliche Kolonieformen sowohl bei den Kontrollen als auch bei Erhitzung von 70° und 80° auf; bei einem anderen nur bei 80° und der Kontrolle. Andererseits kamen die ovalen bezw. birnförmigen Kolonien bei einem auf 70° erhitzten wie auch unerhitzten Rauschbrandfall vor, nicht aber nach Vorbehandlung bei 80°. Auf der Fortner-Platte dagegen wuchsen nur typische Kolonien. In der unerhitzten Rauschbrandkontrollkultur nach Riedmüller fanden sich außer den ovalen auch noch die pararauschbrandähnlichen, rundlich-eckigen Kolonien. In einer Pararauschbrandfrischfleischkontrolle wurden wiederum auch die ovalen bezw. birnförmigen Kolonien festgestellt.

Das einzige Unterscheidungsmerkmal bei den ovalen Kolonien war die frühzeitige Versporung bei Pararauschbrand im Gegensatz zum Rauschbrand.

Zusammenfassend besagt der Versuch, daß nach Erhitzung sowohl nach Riedmüller's Angaben wie auch nach denen der Anstalt Rauschbrand- bezw. Pararauschbrandkolonien aus Frisch- und Trockenfleischen mit dem Riedmüller-Verfahren zu erhalten sind. Erhitzung, besonders auf 80° wirkt sich aber wachstumshemmend aus.

Bezüglich der Kolonieformen und deren Zusammensetzung (Stäbchen, Blähstäbchen, Blähformen, Sporen) wurden die bisherigen Erfahrungen bestätigt.

3. Reinkulturen.

Als weiteres Ausgangsmaterial wurden nun primär aus Plattenkulturen auf verschiedene Weise gewonnene flüssige oder feste Reinkulturen verwendet.

a) Die flüssigen Reinkulturen

betrafen alte oder frische Leber- und Blutbouillonstämme (26 R und 13 PR).

Als Kontrollen dienten auf dem gleichen Nährboden gewonnene Kulturen aus 6 Frischfleischproben (3 R und 3 PR) sowie 4 Trockenfleischproben (2 R und 2 PR).

Die Beobachtung fand nach 12, 24, 36 und 48 Stunden statt.

Insgesamt wurden 47 Objektträgerdeckglaskulturen angelegt.

Nach Keimgehalt wurden jeweils aus den flüssigen Kulturen 1—2 Tropfen übertragen; bei den Kontrollen wie bisher 1 Öse.

Ergebnis:

Bei sämtlichen Kulturen mit Ausnahme jener aus jungen Leberbouillonstämmen war verzögertes Wachsen festzustellen. Es trat schon äußerlich durch die Kleinheit der Kolonien und durch das häufige Fehlen der Agarzerreißung nach 12 Stunden, teilweise nach 24 und sogar noch mehr Stunden in Erscheinung, so daß eine 48stündige Beobachtungszeit erforderlich war.

Atypische, rundlich-eckige Kolonien kamen bei Rauschbrand 4mal vor, bei Pararauschbrand nur unter den Kontrollen.

Der bazilläre Befund war einwandfrei.

Der Versuch zeigt, daß auch mit flüssigen Reinkulturen von Rauschbrand und Pararauschbrand Züchtungsergebnisse nach dem Riedmüller-Verfahren zu erhalten sind. Ein Versagen wurde nicht beobachtet. Am besten eigneten sich außer Bodensatz alter Kulturen neu angelegte, 24 Stunden bebrütete Reinkulturen. Das allgemein verzögerte, bisweilen sogar später einsetzende Wachstum erfordert hier eine bis 36 Stunden dauernde Beobachtung. Die Erhebungen über Form der Kolonien und deren Bazillen deckten sich mit den bisherigen.

b) Die festen Reinkulturen

entstammten Zeissler- oder Fortner-Blutplatten (9 R und

15 PR) und waren vor der Entnahme 1—33 Tage lang im Kühlschrank aufbewahrt gewesen.

Die Beobachtungszeiten betrugen 12 bis 48 Stunden.

Zur Kontrolle dienten Kulturen auf dem gleichen Zysteinagar aus Frischfleisch (1 R und 1 PR).

Die auf den Zeisslernährböden weniger und auf den Fortnernährböden mehr versporten Ausgangskolonien wurden bei Rauschbrand durch Eintupfen in die Kolonie, bei Pararauschbrand durch Abstreichen eines Kolonieausläufers übertragen.

Angefertigt wurden 24 Objektträgerdeckglaskulturen.

Ergebnis:

Von den 9 Rauschbrandkulturen gingen nur 2 an. In einem Falle stammte die Ausgangskolonie aus der Fortnerplatte, war 10 Tage im Kühlschrank gewesen und zeigte schon nach 12 Stunden Wachstum. Im 2. Falle — Züchtung ebenfalls aus einer Fortnerplatte und 6 Tage Kühlschrankaufenthalt — konnte erst nach 24 Stunden spärliches Wachstum mit schlechter Versporung gesehen werden.

Von den angefertigten 15 Pararauschbrandkulturen zeigten nur 5 Wachstum. Die Blutplatten mit den Ausgangskolonien waren 16, 15, 10 und 1 Tag kühl gehalten worden. Kolonien aus der Fortnerplatte gingen am besten an. Die gewonnenen Kolonien waren durchwegs klein, doch stets typisch; die Versporung verzögert. Einmal — Kolonie aus Fortnerplatte und eintägigem Kühlschrankaufenthalt — wurde erst nach 24 Stunden Wachstum beobachtet.

Die mit Frischfleisch beimpften Kontrollen waren normal gut.

Zusammenfassend ergibt der Versuch, daß auch Reinkulturen aus Blutplatten sich für das Riedmüllerverfahren eignen. Kolonien aus der Fortnerplatte zeitigten die besten Ergebnisse. Der Erfolg ist aber um so geringer, je älter die Ausgangskolonie ist.

Außer getrockneter Muskulatur, erhitzter Frisch- und Trok-

kenfleischaufschwemmung und Reinkulturen standen nun noch Frischfleischproben von infizierten Meerschweinchen zur Verfügung. Daß das Riedmüllerverfahren zur Züchtung aus Frischfleisch (Rind!) brauchbar ist, hat der 1. Versuch bereits ergeben. Folglich wäre eine nochmalige Prüfung mit Keimen aus frischen Meerschweinchen an und für sich überflüssig gewesen. Sie wurde aber trotzdem noch mit hereingezogen, um zu erfahren, ob sich allenfalls hinsichtlich der Anschlagshöhe Unterschiede ergeben.

Dem in Versuch I benützten, natürlich infizierten Material (vom Rind) wurde also viel keimreicheres Material vom Impfmeerschweinchen (gewissermaßen Reinkultur!) gegenüber gestellt.

Die einschlägigen Versuche seien hier näher beschrieben.

c) Ödemsaft aus dem Impftier.

Zur Verfügung standen 25 verschiedene infizierte und 0 bis 6 Tage kühl gehaltene Meerschweinchenkadaver (15 R und 10 PR).

Zum Vergleich dienten mit Frischfleisch (2 R und 2 PR und 1 R + PR), mit Trockenfleisch (4 R und 2 PR) sowie mit Blutbouillonreinkultur angezüchtete Kulturen desselben Nährbodens.

Einschließlich der Kontrollen wurden 31 Objektträgerdeckglaskulturen gefertigt.

Zur Beimpfung wurde Ödemsaft genommen; die Aussaat geschah mit einer Öse von 2 mm Weite.

Beobachtungszeit: 12, 24, 36 und 48 Stunden.

Ergebnis:

Von den angelegten 15 Rauschbrand- und den 10 Pararauschbrandkulturen gingen 3 Rauschbrandkulturen nicht an. Die Länge der Lagerung der Meerschweinchen im Kühlraum konnte dafür nicht verantwortlich sein, da diese nur 0, 2 und 3 Tage gelagert waren, während 0—6tägige Lagerung sonst ohne Einfluss war. Der Grad der Agarzerreißung hielt ziemlich Schritt mit der Güte des Wachstums.

Wieder fanden sich pararauschbrandähnliche, rundlich-eckige Kolonieformen beim Rauschbrand (2mal) und auch die beim Rauschbrand (3mal) und Pararauschbrand (1mal) vorkommenden, ovalen Kolonieformen fehlten nicht. Wie früher waren beim Pararauschbrand nach 24 Stunden diese atypischen Formen verschwunden. So verwirrend die atypischen Kolonieformen aber auch wirkten, ihr bazillärer Aufbau ähnelte doch immer mehr dem der jeweils zugehörigen typischen Kolonien. Auffallend war, daß die Kulturen, die von den mit Blutbouillonkulturen infizierten Meerschweinchen stammten, in jeder Hinsicht am üppigsten angingen.

Auch die Vergleichskolonien aus mit Frischfleisch beimpften Kulturen standen diesen nach.

Immer wieder aber bestätigte es sich, daß auf Grund der Kolonieformen allein nicht immer eine einwandfreie Diagnose möglich ist, sondern daß die Zusammensetzung der einzelnen Kolonien mit herangezogen werden muß.

Vergleicht man die Ergebnisse des II. Versuchs mit jenen des I. Versuchs, so ergibt sich, daß allgemein die Züchtung aus Frischfleisch am vorteilhaftesten ist. Je größer die Keimmenge und je zusagender das Medium, aus dem die Keime stammen, ist, desto größer ist auch die Anschlagshöhe in der Riedmüllerkultur. Dem natürlich infizierten Frischfleisch (Rind) gleich, mitunter sogar noch überlegen ist als Ausgangsmaterial Ödemsaft von Meerschweinchen, die mit Blutbouillonkultur infiziert waren. Gut sind auch sporenreiche Kulturen. Lückenhafte Ergebnisse geben Trockenfleisch und Stämme aus Plattenkulturen.

Sicher ist, daß von den im Aussaatmaterial vorhandenen Keimen nur ein Bruchteil sich zu Kolonien entwickelt.

Bei den bisherigen Versuchen waren fast immer Kolonien anzutreffen, die bei Rauschbrand pararauschbrandähnlich und bei Pararauschbrand rauschbrandähnlich waren. Diese Beobachtung führte zu dem weiteren Versuch, ob diese diagnostisch schwierigen Formen nicht ausgeschaltet werden könnten durch

Änderungen an den einzelnen Bestandteilen des Riedmüller'schen Nährbodens.

III. Versuche unter Änderungen am Nährboden.

1. Vermehrung des Agargehaltes.

Zunächst wurde eine Erhöhung der Agarkonzentration versucht, weil an der Anstalt die Erfahrung gemacht wurde, daß im Blutplattenverfahren bei höherer Agardichte durchwegs konstantere und isoliertere Kolonieformen erzielt werden. Demgemäß wurde statt 2,5% nun 4% Agar verwendet. Nach Zugabe von Zystein und Thiodiglykolsäure trübte sich der Agar stark milchig, wurde aber nach Beigabe von NaOH und Schütteln wieder klar.

Ausgangsmaterial: 6 Frischfleischproben (3 R und 3 PR),
4 Trockenfleischproben (2 R und 2 PR),
2 flüssige Reinkulturen (1 R und 1 PR),
8 feste Reinkulturen (5 R und 3 PR) und
14 Meerschweinchenkadaver (7 R und 7 PR).

Ein Teil der Aufschwemmungen von Frisch- und Trockenfleisch wurde vor der Anzüchtung 20 Minuten bei 80° im Wasserbad gehalten, ein anderer Teil 10 Minuten bei 70°. Die flüssigen Reinkulturen stammten aus Blut- und Leberbouillon, die festen aus Fortner- und Zeisslerplatten (nach Fortner bebrütet) [5 und 3]; die Meerschweinchen waren mit Blutbouillonkulturen (8), mit Frischfleisch (3) und mit Leberbouillon (3) infiziert.

Als Kontrollen dienten Kulturen aus 4 Frischfleischproben (2 R und 2 PR), 2 Trockenfleischproben (1 R und 1 PR) und 6 festen Reinkulturen (4 R und 2 PR) auf 2,5%igem Zysteinagar.

Einschließlich der Kontrollen wurden 61 Objektträgerdeckglaskulturen angelegt. Die Aussaatmenge richtete sich nach dem jeweiligen Keimgehalt.

Beobachtungszeiten: 12, 24, 36 und 48 Stunden.

Ergebnis:

Der 4%ige Agar zeitigte fast allgemein ein besseres Angehen der Kulturen. So wuchs z. B. ein auf 70° erhitztes Frischfleisch bei 4%igem Zysteinagar üppig, in 2,5%igem Agar ging aber nur die unerhitzte Kontrolle an. Kolonien aus 0—6 Tagen alten Fortner- bezw. Zeissler-Platten erbrachten mit 4%igem Zystein-Agar ausnahmslos bereits nach 12 Stunden Kulturen; mit 2,5%igem Agar gelang dies nur aus den 0 Tage gelagerten Blutplatten. Nur aus Meerschweinchenödemsaft (Infektion mit Blutbouillonkultur) hergestellte Kulturen waren auf beiden Agarkonzentrationen gleich üppig.

Das Auftreten von atypischen Kolonien konnte der 4%ige Agar nicht verhindern. Sie fanden sich anscheinend umso mehr, je besser das Wachstum war. Die ohnehin schlechter gewachsenen flüssigen Kulturen waren frei von atypischen Kolonien. Beim Rauschbrand kam zum erstenmal deutliches Weiterwachsen noch nach 12 Stunden zur Beobachtung, wobei sich atypische Kolonieformen einmal sichtlich verringert und zweimal restlos in typische verwandelt hatten. Der Pararauschbrand wuchs im großen und ganzen formenreicher.

Mikroskopisch waren bei Rauschbrand früher als bisher und reichlichere Bazillenformen anzutreffen (Keulen, Kugeln, Wetzsteine, Schläuche, Trümmer, Brocken etc.), beim Pararauschbrand waren sie manchmal größer, doch gleichmäßiger (Zitronen, Flaschen und Kugeln verschiedener Größe). Die Eigenfarbe wurde manchmal auffallend stark. Die Sporulation setzte bei Pararauschbrand und bei Rauschbrand meist früher ein. Der Unterschied war aber nach 24 Stunden zur diagnostischen Trennung doch noch deutlich genug. Das durchwegs bessere Wachstum verursachte auch stärkere Zerreißung des Agars und damit wieder frühere Eintrocknung.

2. Änderungen in der Menge der Zusätze zum Agar.

In den folgenden Versuchen wurden die Mengen der Zusätze folgendermaßen geändert:

Zystein: 0%, 0,1%, 0,2% und 0,5%;
Thiodiglykolsäure: 0%, 0,16%, 0,3% und 0,8%;
Traubenzucker: 0% und 2%.

Der Agar wurde dabei in 2,5 und 4%iger Konzentration genommen. Größere Zysteinzugaben bedingten größere NaOH-Mengen und verursachten stärkere Agartrübung.

Als Kontrolle diente 2,5 und 4%iger Agar mit normalen Zusatzmengen.

Ausgangsmaterial: 8 Frischfleischproben (4 R und 4 PR) und 6 Trockenfleischproben (3 R und 3 PR).

Beobachtungszeit: 12, 24, 36 und 48 Stunden.

Einschließlich der Kontrollen wurden 102 Objektträgerdeckglaskulturen gefertigt.

Die Menge des Impfmaterials entsprach der bisherigen.

Ergebnis:

2,5 und 4%iger Agar allein ohne Zusätze versagte völlig;

Agar mit 1% Traubenzucker ebenso.

Agar mit 1% Traubenzucker und steigender Zysteinmenge (0,1 bis 0,5% und entsprechender Menge von Thiodiglykolsäure) ergab Kolonien. Sie waren bei 2,5% Agar und 1% Zystein bei Rauschbrand klein, bei Pararauschbrand häufig atypisch. Bei 4% Agar war das Wachstum besser. Nicht viel günstiger wirkte 2% Zystein bei 2,5 bezw. 4%igem Agar. Das Optimum lag für Rauschbrand bei 0,5% Zystein. Rauschbrandfrischfleisch ergab aber bei beiden Agarkonzentrationen atypische Formen, bei den Kontrollen dagegen nicht. Pararauschbrand war gegenüber den Kontrollen formenreicher.

Agar mit 2% Traubenzucker ließ vor allem die aeroben Begleitkeime gedeihen, was sich auf die anaeroben Kolonien ungünstig auswirkte, ohne die Bildung von atypischen Formen hintanzuhalten.

Agar mit 0,3% Zystein ohne Traubenzucker brachte ledig-

lich Pararauschbrand zum Wachsen. 4%iger Agar war dabei dem 2,5%igen überlegen.

Die verschiedenen Nährbodenzusammensetzungen bedingten auch verschiedene Bilder der Kolonien unter der Ölimmersion.

Bei 0,1% Zystein versporten die Rauschbrandkolonien auffallenderweise ebenso rasch wie die Pararauschbrandkolonien. Die Blähformen waren ziemlich einförmig und unausgebildet. Beim Trockenfleisch war die Entwicklung etwas langsamer. Der Pararauschbrand bildete wohl beim Frischfleisch frühzeitig stark Sporen, nicht aber beim Trockenfleisch.

Bei 0,2% Zystein ähnelte die Zusammensetzung der einzelnen Kolonien ziemlich der der Kontrollen und kam ihr bei 0,5% Zystein gleich.

2% Traubenzucker ergab bei Rauschbrand übergroße Blähformen. Die gegenüber den Kontrollen frühzeitig stärkere Versporung des Pararauschbrandes war zu wenig regelmäßig und daher differentialdiagnostisch nicht verwertbar.

Der ohne Traubenzucker gewachsene Pararauschbrand ließ Blähformen ziemlich vermissen und versporte auch bei 4%igem Agar mit 3% Zystein spät und schlecht.

Hinsichtlich Agarzerreißung, Eintrocknung und Eigenfarbe ergab sich nichts Neues.

Die Kontrollen versagten nie.

Nach Frei und Riedmüller (20) kann Zystein durch Glutathion ersetzt werden, weshalb auch damit noch Versuche angestellt wurden.

3. Verwendung von Glutathion statt Zystein.

Das Glutathion wurde zunächst 0,3 und 0,5%ig genommen mit 1 und 2% bezw. ohne Traubenzucker. Der Agar war 2,5 und 4%ig. Alkalisation des Nährbodens erfolgte mit NaOH.

Als Kontrollen dienten 10 Frischfleischproben (7 R und 3 PR) und 4 Trockenfleischproben (2 R und 2 PR) auf gewöhnlichem Zysteinagar.

Die Menge des Aussaatmaterials war wie bei früheren Versuchen.

Ausgangsmaterial: 10 Frischfleischproben (7 R und 3 PR) und 4 Trockenfleischproben (2 R und 2 PR).

Einschließlich der Kontrollen wurden 59 Objektträgerdeckglaskulturen angelegt.

Beobachtung: Nach 12, 24, 36 und 48 Stunden.

Ergebnis:

2,5% iger Agar mit 0,3% Glutathion und 1% Traubenzucker ließ beim Rauschbrand einmal Wachstum vermissen, nicht jedoch 4% iger Agar. Die Kolonien waren durchwegs kleiner als bei den Kontrollen mit 0,3% Zystein. Beim Pararauschbrand waren atypische Kolonieformen anzutreffen wie bei den Zysteinkontrollen. 2% Traubenzucker bei gleichbleibender Glutathionmenge zeigte überall Wachstum. Die Kolonien waren etwas größer, aber immer noch kleiner als bei Zystein; atypische Formen fehlten nicht.

Agar mit 0,5% Glutathion und 1% Traubenzucker brachte zahlenmäßig etwa gleiches Wachstum wie bei den Zysteinkontrollen. Atypische Formen kamen bei Pararauschbrand und bei Rauschbrand vor.

2% Traubenzucker schien das Mengenwachstum etwas zu begünstigen, das Größenwachstum war unbeeinflußt. Aerobe Kolonien traten vermehrt auf; atypische Kolonieformen blieben auch nicht aus.

Ohne Traubenzucker wuchs weder Rauschbrand noch Pararauschbrand.

Mikroskopisch fiel gegenüber den Zysteinkontrollen vor allem die bisweilen frühzeitige Versporung beim Rauschbrand schon bei 0,3% Glutathion und 1% Traubenzucker auf. Auch der Pararauschbrand zeigte bei Frischfleisch stärkere Versporung. Die Blähformen waren spitz und länglich, die Kugeln kleiner und mengenmäßig geringer als bei den Zysteinkontrollen. Auch

bei 2% Traubenzucker waren die großen Blähformen (Trümmer etc.) seltener wie bei Zysteinagar.

Bei 0,5% Glutathion und 1% Traubenzucker dauerte besonders beim 4%igem Agar das Stäbchenstadium länger an. Rauschbrand versporte beinahe genau so früh und stark wie Pararauschbrand. 2% Traubenzucker schien die Versporung beim Rauschbrand, bei Frischfleisch auch beim Pararauschbrand zu verzögern. Die Unterschiede in der Versporung zwischen Rauschbrand und Pararauschbrand waren bei Glutathion überhaupt nicht so eindeutig wie bei Zystein. Merkwürdig war, daß bei Pararauschbrand manchmal erst spät typische Blähformen zu finden waren. Hoher Glutathiongehalt scheint ebenso wie hohe Zysteinmenge für die Entwicklung der Pararauschbrandbazillen nicht so günstig zu sein.

Im übrigen stimmten die sonstigen Beobachtungen mit den früheren im großen und ganzen überein. Der 4%ige Agar schloß in der Regel besser ab.

Der Versuch ergab somit, daß Glutathion das Zystein ersetzen kann. Besondere Vorteile gegenüber dem Zystein vermag es aber nicht zu geben.

Damit wurden die Versuche mit dem ohnehin teueren Glutathion eingestellt.

In den folgenden Versuchen sollte nun noch geprüft werden, wie lange der Nährboden ohne Einbuße an seiner Brauchbarkeit aufbewahrt werden kann.

4. Verwendung von älteren Nährböden.

Nach Riedmüller ist der in Reagenzgläser abgefüllte Zysteinagar ca. 6—8 Tage haltbar. Die von ihm beschriebenen, nach 3—4 Tagen an der Oberfläche auftretenden Zystinausfällungen konnten gleichfalls beobachtet werden und zwar meist schon bei 3 Tage altem Agar. Bei Glutathionagar wurden bei 13 Tage langer Beobachtung keine derartigen Ausfällungen wahrgenommen.

Die Prüfung erstreckte sich auf 13 Nährbodenreste, die im

Kühlschrank 2 bis 16 Tage aufbewahrt worden waren. Agar war 2,5 und 4 %ig. Als Aussaatmaterial wurde lediglich Rauschbrand beigezogen.

Ausgangsmaterial: Rauschbrand aus Frischfleisch (2), Trokkenfleisch (4) und Meerschweinchenkadaver (2).

Als Kontrollen dienten Kulturen, die mit dem gleichen Aussaatmaterial auf den gleichen Nährböden zeitlich früher angelegt worden waren.

Beobachtung: 12 und 24 Stunden.

Insgesamt wurden 65 Objektträgerdeckglaskulturen angelegt.

Die Menge des Impfmaterials wurde wie früher bemessen.

Ergebnis:

2 bis 4 Tage (Kühlschrank!) alter Zysteinagar ist gleich gut wie frischhergestellter. Auf 5—6 Tage altem Agar erfolgte schwächeres Wachstum und trat beim 2,5 %igem mehr als beim 4 %igen Agar in Erscheinung. Auf Zysteinagar gingen zwar noch nach 10 und 12 Tagen Kulturen an und auf Glutathion noch nach 13 Tagen; mit sicherem Wachstum war vom 7. Tag ab jedoch nicht mehr zu rechnen.

Auffallend war, daß auf 5tägigem und älterem Agar atypische Kolonieformen nicht mehr auftraten. Das Wachstum war sichtlich verzögert. Zur Versporung innerhalb 24 Stunden kam es meist nicht mehr. Mit dem Alter des Nährbodens nahm auch die Eigenfarbe der Kolonien ab, so daß sie nur schwer mehr zu sehen waren.

Mit diesem Versuch waren die Angaben Riedmüller's über die Haltbarkeit seines Nährbodens bestätigt.

Somit waren die Gesamtergebnisse des III. Versuches — Änderungen am Nährboden — kurz zusammengefaßt folgende:

4 %iger Agar ermöglicht ein etwas besseres und stärkeres Angehen der Kulturen; Zysteinverminderung bringt schwächeres Wachstum, Zysteinerhöhung eine Vermehrung der atypischen Kolonieformen; Traubenzuckererhöhung fördert besonders das

aerobe Wachstum. Glutathion (0,5 %) vermag Zystein (0,3 %) zu ersetzen; zur Differentialdiagnose zwischen Rauschbrand und Pararauschbrand bei atypischen Kolonien eignet sich jedoch Zysteinagar besser. Die bestmöglichen Ergebnisse werden erreicht, wenn er nicht älter als 4 Tage verwendet wird.

Die besonders bei gutem und noch mehr bei bestem Wachstum schon im I. Versuch stark und frühzeitig aufgetretene Eintrocknung der Deckglaskulturen konnte durch größere Agarmengen wohl etwas zurückgedrängt, aber noch lange nicht beseitigt werden. Im folgenden sollte nun versucht werden, ob diese unangenehme Eintrocknung nicht mit anderen Mitteln behoben werden kann.

IV. Versuche zur Verhinderung der Agaraustrocknung.

1. Abdichtung mit Paraffin, Wachs und Vaseline.

Riedmüller ließ während der Bebrütung mit Absicht den Agar trocknen und das Kondenswasser seitlich verdunsten, um ein Zerfließen der Kolonien, wie dies bei Plattenaussaaten der Fall sei, nicht befürchten zu müssen.

Um letzteres zu verhüten und trotzdem der weiteren Eintrocknung der Kulturen Einhalt zu gebieten, wurden sie mit Paraffin (Schmelzpunkt 52°) bezw. mit Wachs eingeschlossen und zwar zunächst erst nach 12stündiger Bebrütung. Zum Auftragen der Verschlußmasse diente ein Metallspatel vom Aussehen eines mit Stiel versehenen Dreieckwinkels. Dieser Spatel wurde leicht erhitzt und dann in die jeweilige Verschlußmasse eingetaucht. Das dadurch am Spatel haftenbleibende verflüssigte Paraffin bezw. Wachs wurde rasch an die Deckglasränder der Kulturen gebracht und mit erneut erwärmtem Spatel gleichmäßig angestrichen.

Nachdem Fortner (11) bei seinen Deckglaskulturen Vaseline als Abdichtungsmittel verwendet, wurde auch dieses versucht.

Ausgangsmaterial: 2 Rauschbrandtrockenfleischproben und 5 Meerschweinchenstämme (4 R und 1 PR). Beim Versuch der

Abdichtung mit Vaseline nach 12 Stunden diente wie bei den zugehörigen Kontrollen sporenfreier Ödemsaft sowie sporenfreier Leberabklatsch als Aussaatmaterial.

Als Kontrollen dienten auf gleichem Agar angelegte Kulturen ohne Abdichtung.

Der Agar war wieder 2,5 und 4%ig.

Beobachtungszeit: 12, 24, 36 und 48 Stunden.

Angelegt wurden einschließlich der Kontrollen 42 Objektträgerdeckglaskulturen.

Die Aussaatmenge richtete sich nach dem Keimgehalt des Ausgangsmaterials.

Ergebnis:

Die Versuche befriedigten wenig. Paraffin und Wachs nützten soviel wie nichts.

Besser war Vaseline. Eine Abdichtung damit gleich bei Kulturanlage verhinderte zwar eine Eintrocknung innerhalb 48 Stunden; Kolonien von Rauschbrand und Pararauschbrand entwickelten sich aber in nicht unterscheidbaren Formen. Beim Pararauschbrand fehlten atypische Kolonieformen gänzlich; Rauschbrand zeigte keine typischen Formen und wuchs konfluierend oder anfänglich in geringer Zahl vorhandene typische Formen gingen in atypische flächenhafte über. Dabei traten Stäbchen und Blähstäbchen viel reichlicher und länger, Sporenbildung auch verzögert auf. Das Wachstum war selten vor 36 Stunden beendet und die Vielgestaltigkeit der Keime nahm in den nächsten 48 Stunden zu. Agarzerreißung fehlte fast völlig. Dafür lagen die Kolonien in mehr oder weniger großen Gasblasen.

Wurde die Abdichtung mit Vaseline erst nach 12 stündiger Bebrütung der Deckglaskulturen vorgenommen, so wurde die Eintrocknung ebenfalls bis zu 48 Stunden verhindert, nicht aber das Übergehen der typischen Rauschbrandkolonieformen in atypische.

Bei Vaselineverschluß gelangen auch noch Kulturen auf Agar, der bis zu 15 Tage alt war. Auf 4 und mehr Tage altem Agar war die Sporulation merklich verzögert.

Nachdem die Versuche, der Agaraustrocknung durch Abdichtungsmittel zu begegnen, nicht zum Ziel führten, wurde hiezu noch die Vergrößerung der Aussaatfläche beigezogen.

2. Vergrößerung der Aussaatfläche.

Für die folgenden Versuche wurden Objektträger von 75 mm Länge und 40 mm Breite und 65 mm lange und 40 mm breite Deckgläser und wiederum 2,5 und 4%iger Agar benützt. Durch die Anlage solch großer Kulturen sollte auch geprüft werden, ob aus keimarmem Material durch die dadurch ermöglichte Vergrößerung der Aussaatmenge bessere Kulturresultate erzielt werden können. Dafür schien Ausgangsmaterial, das in früheren Versuchen infolge seiner Keimarmut versagt hatte, am geeignetsten.

Ausgangsmaterial: 3 Rauschbrandtrockenfleischproben.

Als Kontrollen dienten gleiche Kulturen mit 1 Rauschbrandfrischfleisch und Plattenkulturen aus 3 Rauschbrandtrockenfleischproben nach Zeissler, nach Fortner und auf Zeisslernährboden unter Züchtung nach Fortner.

Beobachtung: Nach 12, 24, 36 und 48 Stunden.

Angefertigt wurden 8 große Objektträgerdeckglaskulturen, 6 Zeissler- und 2 Fortnerblutplatten.

Die Menge des Impfmaterials betrug auf den Mikrokulturen je 3 Oesen von 3 mm Weite, auf den Blutplatten je 2 Oesen.

Ergebnis:

Von den bisher auf Zysteinagar nicht angegangenen 2 Rauschbrandtrockenfleischproben ging nun bei vergrößerter Aussaatfläche ein Fall auf 2,5 und 4%igem Agar an. Der zweite Fall versagte wiederum. Das dritte Trockenfleisch, das bisher nur auf 4%igem Agar Wachstum gezeigt hatte, war nun auch bei 2,5%igem Agar angegangen. Die Rauschbrandfrischfleischkontrolle war gut.

Auf den Kontrollblutplatten nach Fortner waren alle 3 Trockenfleischproben, auf den Zeisslerblutplatten aber nur eine angegangen.

Atypische Kolonien waren nur bei der Frischfleischkontrolle vertreten und zwar auffallenderweise bei 2,5"„igem Agar anfänglich stärker.

Die Agarzerreißung hielt mit dem Wachstumsgrad Schritt. Eigenfarbe trat erst bei gutem Größenwachstum und besonders beim 4%igen Agar auf. Eintrocknung war bei allen großen Deckglaskulturen bereits nach 24 Stunden vorhanden und nahm dann auch noch stark zu.

Die Entwicklung der Bazillenformen ging gegenüber der Kontrolle verhältnismäßig langsam vor sich. Erst bei 36 Stunden war überall Versporung feststellbar.

Die größere Aussaatfläche hat somit die Anschlagshöhe etwas erhöht, die Eintrocknung war aber trotzdem stark.

Auf Grund der bisherigen Versuche lassen sich zusammenfassend als brauchbar somit folgende Ergebnisse herausschälen.

Ausgangsagar in etwa 10 ccm Abfüllungen vorrätig zu halten, ist vorteilhaft;

4%iger Agar gibt etwas besseres und auch stärkeres Angehen, aber auch etwas mehr atypisches Wachstum;

0,3% Zysteinmenge ist am geeignetsten.

Als Ersatz kann 0,5% Glutathion gelten.

1% Traubenzucker kann nicht entbehrt werden,

2% begünstigten aber lediglich das Aerobenwachstum.

Die Zusätze werden am besten bei 60—70° C unter Schütteln beigemengt; die Reaktion des Nährbodens ist vor Gebrauch nachzuprüfen; das Aufgießen des Agars mittels Pipette ist dem Ausgießen vorzuziehen; größere Agarmengen zwecks Erhalt eines Agarwulstes um das Deckglas herum sind vorteilhaft; die Verwendung von Objektträger und Deckglas ist handlicher.

Über 4 Tage alter Nährboden bietet keine Gewähr mehr

für optimales Angehen und Wachsen; Vaselineverschluss ist brauchbar, hat jedoch schlecht differenzierbare Kolonieformen zur Folge.

Die Verwendung übernormalgroßer Objektträger und Deckgläser kann bei keimarmem Material vorteilhaft sein; die zur Beimpfung benötigte größere Impfmaterialmenge kann sich aber für die Entwicklung der Kolonieformen störend auswirken. Deshalb sind bei keimarmem Aussaatmaterial mehrere gleichzeitig angelegte Kulturen (ohne Verdünnungen) vorzuziehen.

Die Untersuchung der aufgegangenen Kolonien mit Ölimmersion ist sehr wertvoll und bei Verwendung von Objektträgerdeckglaskulturen sehr einfach; für die Beobachtung der Koloniefom genügt Lupenbetrachtung.

Alle diese Punkte wurden nun in dem noch folgenden Schlußversuch entsprechend verwertet.

V. Abschließender Versuch.

Benützt wurden 2,5 und 4%iger, jeweils frisch hergestellter Agar mit Zusatz von 0,3% Zystein, 0,5% Thiodiglykolsäure und 1% Traubenzucker. Die Reaktion wurde vor der Kulturanlage nachgeprüft. Die pibettierte Agarmenge war wieder so erhöht, daß die Deckglasränder auf den normalen Objektträgern vom Agar wulstartig abgeschlossen wurden. Weitere Abdichtung unterblieb.

Als Ausgangsmaterialien für den Schlußversuch dienten Frisch- und Trockenfleischproben sowie Kolonien aus Objektträgerdeckglaskulturen.

1. mit Frischfleisch.

Ausgangsmaterial: 7 Frischfleischproben (2 R und 4 PR sowie 1 R + PR).

Die Beimpfung des Agars erfolgte durch Abklatsch vom Frischfleisch mit dem Deckglas bezw. durch Bestreichen desselben mit dem Frischfleisch.

Als Kontrollen dienten Zeissler- und Fortnerblutplatten.

Angelegt wurden 14 Objektträgerdeckglaskulturen, 7 Blutplatten nach Fortner und 14 nach Zeissler.

Die Menge des Aussaatmaterials war nach dem anaeroben Keimgehalt verschieden groß.

Beobachtungszeiten: 12, 24, 36 und 48 Stunden.

Ergebnis:

Sämtliche 7 Frischfleischproben gingen schon bei der 1. Züchtung an. Agarzerreißung fehlte nie; Eintrocknung war nur einmal schon bei 24 Stunden, sonst erst bei 36 Stunden aufgetreten; nach 48 Stunden war sie zum Teil sehr stark. Mengen und Größenwachstum war auf 4% igem Agar sehr gut und ohne vermehrtes Vorkommen atypischer Kolonieformen. Besonders vorteilhaft trat das bessere Größenwachstum in 4%igem Agar bei dem Mischinfektionsfall zutage. Gut gewachsene Kolonien waren selten ohne Eigenfarbe, besonders beim 4%igen Agar. Pararauschbrand wies durchwegs nach 12 Stunden schon Sporen auf, Rauschbrand aber nicht. Die früheste und stärkste Sporulation war bei 4%igem Agar zu finden.

Im übrigen wurden neue Beobachtungen nicht gemacht.

Die Kontrollen waren einwandfrei, mit Ausnahme des Mischinfektionsfalles, wo auf den Fortnerblutplatten Pararauschbrandkolonien nicht aufgegangen waren.

Aus den Frischfleischproben konnten mit dem Riedmüller'schen Züchtungsverfahren somit in allen Fällen diagnostisch brauchbare Ergebnisse erzielt werden.

2. mit Trockenfleisch.

Ausgangsmaterial: 62 Trockenfleischproben (32 R und 30 PR) aus den Jahren 1932 und 1933.

Als Kontrolle diente der gleiche Agar, beimpft mit bereits geprüften, sicher angehendem anderen Ausgangsmaterial (8 R und 4 PR).

Angezüchtet wurden einschließlich der Kontrollon 209 Objektträgerdeckglaskulturen.

Die Menge des Aussaatmaterials betrug entsprechend dem Sporengehalt 1—2 Ösen.

Beobachtung: Nach 12, 24, 36 und 48 Stunden.

Ergebnis:

Von den 32 Rauschbrandtrockenfleischproben waren auf die erste Anzüchtung hin nur 21 angegangen, 9 erst bei Wiederholungen und 2 versagten völlig.

Von den 30 Pararauschbrandproben wuchsen 28 sofort und 2 bei Wiederholung der Kultur. Außerdem bestanden Unterschiede hinsichtlich 2,5 oder 4%igem Agar. Die jeweiligen Kontrollen lieferten in allen Fällen sofort nur gute Kulturen. Damit lag die Anschlagshöhe wesentlich unter jener bei Frischfleisch als Ausgangsmaterial.

Wenn Wachstum ausblieb, fehlte auch die Agarzerreißung; manchmal lagen die Kolonien nur in Gasblasen. Die Eintrocknung war selten schon nach 24 Stunden vorhanden. Die Eigenfarbe wechselte stark, oft sogar in der gleichen Kultur derart, daß farblose und dunkle Kolonien nebeneinander vorkamen. Letztere besonders, wenn lauter Blähformen vorhanden waren. Bei einem Pararauschbrand z. B. waren die rundlichen, atypischen Kolonieformen fast schwarz gegenüber den typischen Kolonien. Die Farbe ging später wieder zurück.

Entsprechend typische Kolonien fehlten in keinem Falle. Daneben traten aber besonders beim Pararauschbrand sehr viele atypische Kolonieformen auf. Diese verschwanden jedoch manchmal später wieder und zwar mehr beim 4%igen Agar. Dieses Größenwachstum noch nach 12stündiger Bebrütung wurde auch beim Rauschbrand vereinzelt gesehen und war bei 4%igem Agar besonders wertvoll in den 5 Fällen, bei denen Rauschbrand und Pararauschbrand gleichzeitig vorlagen. Dabei ergab der 4%ige Agar ausgeprägtere Pararauschbrandkolonien als der 2,5%ige. Nur in einem Falle war es umgekehrt. Dafür bot aber die sehr frühe und starke Versporung eine Handhabe zur Unterscheidung

vom Rauschbrand. Auch bei den Kontrollen fanden sich die atypischen Kolonien besonders beim Pararauschbrand.

Daß auch die frühzeitige Versporung nicht immer ganz zuverlässig ein Unterscheidungsmerkmal zwischen Rauschbrand und Pararauschbrand ist, wurde zweimal beobachtet. In einem Rauschbrandfall wiesen die typischen Kolonien bereits nach 12 Stunden ziemlich deutliche, wenn auch noch nicht starke Versporung auf, während atypische Kolonieformen von Pararauschbrand etwas weniger Versporung wie die typischen erkennen ließen. Diese Beobachtung ist wichtig, weil sie zeigt, daß die Versporungszeit kein absolutes Unterscheidungsmerkmal zwischen Rauschbrand und Pararauschbrand abgibt.

Der 4%ige Agar ließ Rauschbrand im allgemeinen etwas eher und stärker versporen als der 2,5%ige. Das bessere Angehen und besonders die Größe der Kolonien auf dem 4%igen Agar jedoch waren vorteilhaft, bedingten allerdings wieder atypische Kolonieformen öfters als beim 2,5%igen Agar.

Wie schon früher wurde auch in diesem Versuch beim Rauschbrand Angehen erst nach 12 Stunden und Weiterwachsen noch nach dieser Zeit beobachtet. Die Beobachtung nach 24 Stunden ist am günstigsten; im Hinblick auf vereinzeltes Spätwachstum kann jedoch die Beobachtung nach 36 Stunden nicht ganz entbehrt werden. Öfter wie sonst lagen Kolonien mit stärkster Eigenfarbe neben fast farblosen in einer Deckglaskultur nebeneinander.

Neue wesentliche Gesichtspunkte ergaben sich nicht.

Anhangsweise wurde nun noch versucht, auch Kolonien aus dem Riedmüller'schen Nährboden zu isolieren und als Ausgangsmaterial für Weiterzüchtung zu verwenden.

3. mit reinen Kolonien aus Objektträgerdeckglaskultulturen.

Riedmüller zeichnet isoliert liegende Kolonien von beiden Seiten auf den Deckgläsern an, hebt das eine Deckglas ab

und sticht die betreffende Kolonie mit der Nadel oder einem Spatel heraus.

Beim Versuch, von den Doppeldeckglaskulturen ein Glas abzuheben, kam es nach mehr als 12stündiger Bebrütung der Kulturen häufig vor, daß ein oder beide Gläser zerbrachen. Die Kultur ist dann kaum mehr zu finden. Bei Verwendung von Objektträgern als Kulturunterlage geht es besser. Weiterhin wurde die Kennzeichnung mit dem Diamantmarkierapparat von Winkel, Göttingen, vorgenommen und zwar an Objektträger und Deckglas. Beim Abheben zersplitterte dann höchstens noch das Deckglas; manchmal geht der Zysteinagar mit dem Deckglas auch mit. Soweit zur Weiterzüchtung von Kulturen atypische Kolonien herangezogen wurden, waren sie wenigstens 24 Stunden alt.

a) Weiterführung von Reinkulturen aus Riedmüller-agar in flüssige Nährböden.

Zunächst wurde die Weiterzüchtung von Deckglaskulturen in flüssigen Nährböden versucht.

Isolierte Kolonien wurden mit dem bei den Plattenverfahren gebräuchlichen Agarheber herausgestochen und in kurz vorher ausgekochte Leberbouillon verbracht. Die betreffenden verschieden alten Kolonien entstammten jeweils 2,5 und 4%igem Agar.

Ausgangsmaterial: Kolonien aus 14 Objektträgerdeckglaskulturen (6 R und 8 PR).

Kontrollen: Die gleichen Primärkolonien wurden auch gleichzeitig zur Züchtung von Subkulturen mittels des Riedmüllerverfahrens verwendet.

Die Menge des in die Röhrchen verbrachten Ausgangsmaterials entsprach ungefähr je einer halben Primärkolonie. Mit der anderen Hälfte wurden die Kontrollen beimpft.

Ergebnis:

Von den Rauschbrandkulturen aus 4%igem Agar gingen alle an, von jenen aus 2,5%igem Agar nur eine. Dabei wuchs

die Leberbouillonkultur aus 4%igem Gluthationagar gleich gut wie die einzig angegangene Leberbouillonkultur aus 2,5%igem Zysteinagar. Die Ausgangskolonien waren dabei 4, 7 und 12 Tage alt. Die 4tägigen waren die besten.

Mit Pararauschbrand beimpfte Leberbouillonröhrchen zeigten durchwegs schon nach 24 Stunden gutes bis sehr gutes Wachstum. Die Ausgangskolonien waren hier 2, 7 und 12 Tage alt. Ein Unterschied zwischen Kolonien, die aus 4%igem und 2,5%igem Agar stammten, bestand nicht.

Somit lassen sich von Kolonien aus Objektträgerdeckglaskulturen, die mit dem Riedmüller'schen Verfahren gewonnen worden waren, flüssige Reinkulturen gewinnen. Jüngere Ausgangskolonien sind besser; solche aus 4%igem Agar versagten nie.

Nunmehr wurden feste Nährböden zur Weiterzüchtung genommen.

b) Weiterführung von Reinkulturen aus Riedmüller-agar auf Blutplatten.

Typische und atypische Kolonien wurden nur auf die Fortnerblutplatte verbracht und nach Fortner behandelt. Die Fortnerplatte wurde deshalb allein gewählt, weil nach den Erfahrungen der Anstalt auf ihr die Subkulturen am sichersten gelingen.

Ausgangsmaterial: 2 atypische Pararauschbrandkolonien aus Riedmüllerkulturen und zum Vergleich 2 typische Rauschbrandkolonien von Deckglaskulturen nach Riedmüller.

Beobachtung: 24 Stunden.

Ergebnis:

Die atypischen Pararauschbrandkolonien gingen auf der Fortnerplatte sehr schön auf und zeigten nach 24 Stunden Brutschrankaufenthalt nur typische Pararauschbrandkolonien. Auch die typischen Rauschbrandkolonien waren gut und eindeutig angegangen. Die Ausgangskolonie vom 4%igen Zysteinagar

ergab dabei, was Menge und Größe anlangt, ein etwas besseres Wachstum. Daraus geht hervor, daß Rauschbrand und Pararauschbrandkolonien aus dem Riedmülleragar auf der Fortnerplatte angehen. Zweifelhafte Kolonieformen aus Riedmüllerkulturen können also auch auf diesem Wege bestimmt werden.

c) Weiterführung von Reinkulturen aus Riedmüller-agar auf ebensolchen.

Kolonien aus Objektträgerdeckglaskulturen wurden wieder in solche verbracht. Das Ausgangsmaterial für diese Deckglaskulturen, denen die Kolonien entnommen wurden, waren meist Frisch- und Trockenfleischproben und vereinzelt auch Blutplatten und Leberbouillonkulturen. Nebenbei wurden auch noch Kolonien aus Blutplatten und Leberbouillonkulturen, die meist selbst wieder aus Objektträgerdeckglaskulturen gewonnen waren, mitangezüchtet.

Ausgangsmaterial: 56 (32 R und 24 PR) Kolonien (bezw. Kulturen).

Als Kontrolle diente gleicher Agar mit Rauschbrandtrockenfleisch beimpft.

Angelegt wurden insgesamt 68 Kulturen.

Die angezüchtete Menge betrug jeweils eine Kolonie (bezw. richtete sich bei den flüssigen Kulturen nach dem Sporengehalt).

Beobachtungszeiten: Nur 12 und 24 Stunden.

Ergebnis:

12 Tage alte Rauschbrandkolonien aus 2,5 und 4%igem Glutathionagar gingen nicht mehr an, wohl aber Pararauschbrandkolonien gleichen Ursprungs und Alters.

7 Tage alte Rauschbrandkolonien aus 2,5 und 4%igem Zysteinagar versagten, nicht ganz aber die Pararauschbrandkolonien.

4 Tage alte Kolonien von Rauschbrand aus Zysteinagar zeigten auch noch kein Wachstum, erst 2tägige Kolonien von Rauschbrand gingen an wie die vom Pararauschbrand. Atypische Kolonieformen waren dabei nur bei Pararauschbrand auf 4%igem Zysteinagar aufgetreten.

7tägige Kolonien aus Blutplatten und 2 bezw. 9tägige Leberbouillonkulturen, deren Ausgangsmaterial wie schon erwähnt Kolonien von Objektträgerdeckglaskulturen gebildet hatten, eigneten sich durchwegs besser zur Weiterzüchtung auf Riedmülleragar als Kolonien unmittelbar aus Objektträgerdeckglaskulturen. 4%iger Agar hat sich auch hier durch besseres Angehen und Wachstum abgehoben. Das Auftreten atypischer Koloniefformen überwog dabei gegenüber dem beim 2,5%igen Agar nicht eindeutig.

Auch an der bazillären Entwicklung der Kolonien ließ sich der Einfluß des Ausgangsmaterials nicht verkennen insoferne als Kolonien von Kulturen unmittelbar aus Objektträgerdeckglaskulturen eine deutliche Verzögerung aufzeigten gegenüber Kolonien von Kulturen aus Blutplatten und Leberbouillonkulturen, die Kolonien aus Objektträgerdeckglaskulturen entstammten.

Die mit Zysteinagar angelegten Kontrollen waren durchwegs reichlich und gut angegangen.

Der Versuch zeigt, daß Kolonien, die mit der Riedmüllermethode erhalten worden waren, nicht nur in flüssigen und auf festen Nährmedien weiterwachsen, sondern auch in Objektträgerdeckglaskulturen nach Riedmüller selbst, besonders wenn 4%iger Agar zur Verwendung kam.

Eindeutig besser waren allerdings die Ergebnisse, wenn die Kolonien aus Riedmülleragar erst über Blutplatten oder Leberbouillon geschickt wurden und dann damit erst wieder Objektträgerdeckglaskulturen angelegt wurden.

ZUSAMMENFASSUNG.

Nach den vorliegenden Versuchen gelingt es, mit dem Riedmüllerverfahren diagnostisch brauchbare Rauschbrand- und Pararauschbrandkolonien zu gewinnen und zwar nicht nur aus Frischfleisch, sondern auch aus Trockenfleisch und Reinkulturen.

Die Fleischvorbehandlung nach Riedmüller — 20 Minuten langes Erhitzen bei 80° C — wirkt schädigender als das an der

Anstalt übliche Erhitzungsverfahren (10' bei 70°). — Die Anschlagshöhe bleibt im allgemeinen hinter der der Blutplattenverfahren zurück.

Rauschbrandähnliche Kolonien beim Pararauschbrand und umgekehrt lassen sich nicht ausschalten.

Zur Bestimmung der Kolonieform eignet sich am besten das Mikroskop unter Benützung mittlerer Vergrößerungen.

Der feinere Aufbau der einzelnen Kolonien sowie die Entwicklung der Bazillen von der Spore bis wieder zur Spore läßt sich am deutlichsten mit der Ölimmersion verfolgen.

Rauschbrandkulturen versporen im allgemeinen nicht so frühzeitig und nicht so stark wie die von Pararauschbrand. Dieses ziemlich gleichmäßig auftretende Unterscheidungsmerkmal läßt sich bei Verwendung von 0,3%igem Zysteinagar zur Erkennung atypischer Kolonieformen heranziehen. Die diagnostisch ausgeprägtesten Koloniebilder findet man nach 24, seltener erst nach 36 Stunden.

Das Riedmüller'sche Verfahren ist einfach, billig und verhältnismäßig rasch durchführbar.

Als brauchbar können folgende Änderungen angesehen werden:

Einbetten des Agars zwischen Deckglas und Objektträger;

Beimpfen des Deckglases durch Ausstreichen mit Frischfleischstückchen;

Herstellung gleich mehrerer Kulturen mit gleicher Impfmaterialmenge besonders bei keimarmem Material; weniger die Verwendung besonders großer Deckgläser und Objektträger zur Aussaat.

Die Verwendung von 4%igem Agar neben dem 2,5%igen Originalnährboden; letzterer liefert in der Regel diagnostisch eindeutigere Kolonieformen, ersterer gewährleistet besseres Angehen.

Unter Verwertung dieser Änderungen erscheint das Ried-

müllerverfahren zur praktischen Rauschbranddiagnose geeigneter. Die Blutplattenverfahren vermag es jedoch nicht voll zu ersetzen.

Außerdem sind noch folgende, in meinen Versuchen festgestellte Einzelheiten erwähnenswert;

Die Zusätze zum Agar erfolgen am besten bei 60—70° C; deren homogene Verteilung durch Schütteln ist wichtig.

Unmittelbar vor Gebrauch der Nährböden empfiehlt es sich deren Reaktion nochmals nachzuprüfen.

Älterer als 4tägiger Zysteinagar gibt unsichere Ergebnisse. 0,5% Glutathion vermag 0,3% Zystein vollwertig zu ersetzen, ist aber teuerer.

Die von Riedmüller angegebene Menge der Zusätze ist die brauchbarste; mehr Zysteinzusatz hindert die Entwicklung der Pararauschbrandkolonie und fördert die Entwicklung atypischer Kolonieformen beim Rauschbrand; weniger Zystein hemmt des letzteren Angehen und Wachstum. Steigerung des Traubenzuckergehaltes begünstigt das Wachstum von Aerobiern, Fehlen desselben macht das Verfahren für die Kultur von Rauschbrandbazillen untauglich. Die Verwendung von Objektträger und Deckglas statt 2 Deckgläsern macht das Verfahren handlicher. Eine derartige Deckglaskultur kann wie jedes andere mikroskopische Präparat gehandhabt werden.

Eintrocknung des Nährbodens der Mikrokulturen läßt sich durch erhöhte Agarmengen nur etwas hinausschieben, durch Verschluß mit Vaseline aber verhindern. Das dabei auftretende Verlaufen der Kolonien macht jedoch solche Kulturen diagnostisch unbrauchbar. Der einzige Vorteil dabei ist, daß auch ältere Zysteinnährböden hier noch Wachstum zeitigen können.

Zur Weiterzüchtung von Kulturen ist die vorherige Kennzeichnung der Lage der Kolonien nötig, wozu sich ein Diamantmarkierapparat gut eignet. Die Weiterführung von Kolonien aus Riedmüllerkulturen gelingt sowohl in flüssigen Nährmedien und auf Blutplatten als auch wiederum auf Riedmüllernährböden; 4%iger Agar liefert dabei die besseren Ergebnisse.

Am Ende meiner Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, dem stellvertretenden Direktor der Veterinärpolizeilichen Anstalt, Herrn Dr. Lang, für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung des Materials sowie für die gütige Anleitung und Beratung während der Arbeit meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Desgleichen fühle ich mich Herrn Veterinärmedizinalrat Hahn für die freundliche Beihilfe und Anleitung bei der Durchführung meiner Versuche zu großem Danke verpflichtet.

Literatur-Verzeichnis.

1. Aksjanzew-Malkin. Die Oberflächenkultur der Spirochäta pallida. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1933. Bd. 129. S. 405.

2. d'Antona. Terrew al ferro porfirizzato per la coltura dei batteri anaërobi in presenza di aria. (Giorn. Batter. 11, 273—288, 1933). Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1934. Bd. 114. S. 427.

3. Bachmann. Experimenteller Beitrag zur anaeroben Oberflächenkultur. I. Mitteilung. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1934. Bd. 132. S. 366.

4. Cech. Eine Vereinfachung der anaeroben Technik und die damit erzielbaren Resultate. (Doj. Zdrav. L. 1928, 268). Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1929. Bd. 95. S. 477.

5. v. Dimitrijević-Speth und Vera Kitschevaz. Der anaerobe hängende Tropfen und die anaerobe Mikrokultur. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1931. Bd. 119. S. 141.

6. Ehrenberg. Simple method of producing anaërobic conditions. (J. of. Bakt. 1927, 14, 391). Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1928. Bd. 90. S. 135.

7. Fortner. Ein einfaches Plattenverfahren zur Züchtung strenger Anaerobier (anaerobe Bazillen — filtrierbare anaerobe Bakterien — Spirochaeta pallida). Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1928. Bd. 108. S. 155.

8. Fortner. Demonstration zur Technik der Anaerobiose. Sitzung der Berliner mikrobiol. Gesellsch. vom 13. 2. 1928. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1928. Bd. 89. S. 286.

9. Fortner. I. Zur Technik der anaeroben Züchtung.
II. Zur Differenzierung der Anaerobier.
Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1929. Bd. 110. S. 233.

10. Fortner. Die Reinzüchtung der fusiformen Bazillen aus dem Zahnbelag. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1929. Bd. 112. S. 388.

11. Fortner. Die Mikroskopie der aeroben und anaeroben Oberflächenkolonien auf hängendem Agar. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1930. Bd. 115. S. 96.

12. Fortner. Zur Frage der Veränderlichkeit anaerober Bazillen (Fraenkel'scher Gasbrandbazillus — Nekrose – bazillus — Bak. Botulinus). Sitzung der Berliner mikrobiol. Gesellsch. vom 27. 5. 1930. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1930. Bd. 98. S. 333.

13. Fortner. Neuzeitliche Oberflächenkultur und Mikroskopie der Anaerobier (dargestellt am Beispiel des Bac. Botulinus). Zeitschr. f. Infekt Krankh. der Haustiere. 1931. Bd. 40. S. 258.

14. Fortner. Die Mikroskopie des lebenden, ungefärbten Bakteriums. Sitzung der Berliner mikrobiol. Gesellsch. vom 26. 10. 1931. D. T. W. 1932. Nr. 30. S. 465.

15. Fortner. Bericht über die 15. Tagung der „Deutschen Vereinigung für Mikrobiologie" vom 21.—23. September 1932 in Gießen. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1933. Bd. 127. Beiheft S. 214.

16. Frei. Das Problem der Anaerobiose. B. T. W. 1934. Nr. 12. S. 198.

17. Frei und Golledge. Das Reduktionsvermögen des Gewebes infizierter Tiere. Zeitschr. f. Infekt. Krankh. der Haustiere 1932. Bd. 41. S. 306.

18. Frei und Hall. The cultivation of anaerobic bacteria in media containing cysteine. (Die Züchtung anaerober Bakterien auf Zysteinhaltigen Nährböden). — Inst. of. Veterin. Path. Univ. Zürich — [Vet. J. 87. 259—266 (1931)] Referat Jahresbericht über die Veterinärmedizin 1932. Jg. 51. Bd. 2. S. 768.

19. Frei und Riedmüller. Die Verwendung des Zysteins bei der Anaerobenzüchtung. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1930. Bd. 119. S. 282.

20. Frei und Riedmüller. Reduktionspotential und Anaerobenzüchtung, Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1931. Bd. 121. S. 97.

21. Fukushima und Hosoya. A study on the culture media of spirochaeta. Scientific Reports from the Government Institute for Infektions Diseases. The Tokyo Imperial University 1926. 5 p. 151. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1928. Bd. 88. S. 282.

22. Gins. Bericht über die 15. Tagung der „Deutschen Ver-

einigung für Mikrobiologie" vom 21.—23. 9. 1932 in Gießen. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1933. Bd. 127. Beiheft S. 214.

23. Gins. Vergleichende Untersuchungen mit anaeroben Züchtungsverfahren. Sitzung der Berliner mikrobiol. Gesellsch. vom 17. 10. 1932 Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1933. Bd. 108. S. 143. (B. T. W. 1933. Nr. 14. S. 223).

24. Gori. Dispositivo per determinare una rarefazione facilmente regolabile. (Boll. Ist. sieroter. milan. 12. 700—704. 1933). Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1934. Bd. 113. S. 430.

25. Grimm. Die Unterscheidung von Rauschbrand — und Pararauschbrandbazillen mittels der Hämolyse — Reaktion im Reagenzglas. Inaug. Diss. Gießen 1934.

26. Handuroy et Erhinger. Un nouvel appareil, pour la culture des microbes anaérobies. (C. r. Soc. Biolog. 1932. 110. 784). Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1933. Bd. 109. S. 383.

27. Hauptmann. Zur apparatlosen Oberflächenzüchtung von pathogenen Anaeroben. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1931. Bd. 121. S. 384.

28. Herrington und Knaysi. A simple method of growing anaerobes in Petri dish cultures. (J. Bacter. 19. 101—103. 1930.) Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1931. Bd. 100. S. 334.

29. Herrmann. An improved method for the cultivation of anaërobic microorganismus. (J. Bakter. 1932. 23. 331). Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1933. Bd. 108. S. 189.

30. Hoder. Anaerobenzüchtung auf Schiefagar. Zentralbl f. Bakt. I. Abt. Orig. 1930. Bd. 117. S. 542.

31. Hosoya-Seigo. A new method for the cultivation on anaerobic bacilli with cysteine in media. (Japan. med. World. 1926. 6, p.83). Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1927. Bd. 86. S. 285.

32. Jacobsthal. Bericht über die 15. Tagung der „Deutschen Vereinigung für Mikrobiologie" vom 21.—23. 9. 1932 in Gießen. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1933. Bd. 127. Beiheft S. 214.

33. Jusatz. Zur Technik des Fortner'schen Anaerobenzüchtungsverfahrens. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1933. Bd. 127. Beiheft S. 212.

34. Karmann. Sitzungsbericht der Berliner mikrobiolog. Gesellsch. vom 19. 2. 1928. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1928. Bd. 89. S. 287.

35. Kishins, Shigaki. On the relation of the quantity of cystine in bacterial protein and the anaerobiosis. (Jap. J. exper. Med. 7, 575—577. 1929.) Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1930. Bd. 99. S. 187.

36. Kleinsorgen und Jusatz. Die Vervollkommnung der Fortner'schen Anaerobenzüchtung durch Anwendung eines kombinierten Gummi-Zelluloseringes mit Druckklammerverschluß. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1932. Bd. 126. S. 157.

37. Klocker. Zur Brauchbarkeit der anaeroben Züchtungsmethode nach Fortner für die Rauschbranddiagnose. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1932. Bd. 125. S. 525.

38. Knorr. Die Anaerobenkultur. Arch. f. Hyg. 1929. Bd. 101. S. 257. (Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1930. Bd. 96. S. 239.)

39. Knorr. Ein Brutschrank für Anaerobier (Anaërostat). Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1930. Bd. 117. S. 154.

40. Koch. Einfache Anaerobenzüchtung in Petrischalen. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1934. Bd. 132. S. 358.

41. König. Untersuchungen über das Vorkommen von Rauschbrandbazillen im Fleisch geschlachteter Rinder. Inaug. Diss. München 1932.

42. Konrich. Notiz zur Anaerobenzüchtung im Hochvakuum. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1931. Bd. 121. S. 512.

43. Levinthal. Nährbouillon und Nähragar mit verbesserter Fleischausnutzung. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1931. Bd. 121. S. 513.

44. Lode. Ein weiterer Beitrag zur Frage der Züchtung der Anaerobier. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1932. Bd. 123. S. 385.

45. Mason. A note on the cultivation of anaerobes (Onderstep J. vet. Sci. 2. 29—32. 1934). Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1934. Bd. 115. S. 537.

46. Mießner und Schoop. Die Fortnermethode in der Diagnostik der Gasödembazillen. D.T.W. 1934. Nr. 21. S. 323.

47. Neumann. Die mikroskopische Beobachtung wachsender Mikroorganismen. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1929. Bd. 114. S. 228.

48. Neumann. Die Isolierung und die Entwicklung von Anaerobiersporen. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1930. Bd. 115. S. 100.

49. Plotz. Culture des anaérobies dans des milieux contenant des glucides évolués (C. r. Soc. Biol. 103. 591. 1930.) Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1930. Bd. 99. S. 186.

50. Quastel, Stephenson und Wetham. Einige Reaktionen von ruhenden Bakterien in Beziehung zum anaeroben Wachstum. (Bioch. J. 1925. 19 p. 304 [nach Chem. Zentralbl. 1925, II.]) Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1926. Bd. 82. S. 377.

51. Quastel und Woolf. Das Gleichgewicht zwischen l—Asparaginsäure, Fumarsäure und Amoniak in Gegenwart ruhender Bakterien. (Bioch. J. 1926. 20, p. 545). Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1927. Bd. 86. S. 282.

52. Reeves. An improved method of obtaining surface colonies of anaerobic bacteria. (J. Bacter. 26, 471—474. 1933). Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1934. Bd. 113. S. 430.

53. Riedmüller. Ein Einfaches Züchtungsverfahren für die Gasbranddiagnostik. D.T.W. 1933. Nr. 39. S. 609.

54. Rimpau. Zur Anaerobenzüchtung. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1931. Bd. 120. S. 143.

55. Ritter und Dorner. Behebung eines wichtigen Nachteils des anaeroben Pyrogallolverschlusses. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1932. Bd. 125. S. 379.

56. Schain. Züchtungsmethoden von Anaerobiern nach der Methode Fortner. B.T.W. 1930. Nr. 42. S. 797.

57. Schmidt. Beitrag zur Anaerobenzüchtung. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1933. Bd. 127. S. 378.

58. Schreiber. Die Rauschbranddiagnose mit dem Fortnerverfahren. Inaug. Diss. Gießen 1933.

59. Scott und Brandly. The use of reduced iron for the cultivation of anaërobic organisms. (J. Bakter. 26, 1—7. 1933). Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1934. Bd. 112. S. 575.

60. Snieszko. The growth of anaerobic bacteria in Petri dish cultures. (Zentralbl. f. Bakter. II. 82. 110—111. [1930]). Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1931. Bd. 102. S. 142.

61. Sonnenschein. Leuchtvibrionen als Sauerstoffzehrer bei der Anaerobenzüchtung und als Sauerstoffindikator. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1932. Bd. 123. S. 378.

62. Tempé. Technique de culture en surface des microbes anaérobies. (C. r. Soc. Biolog. 1931. 107. 1021). Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1932. Bd. 104. S. 523.

63. Trautwein. Ein Beitrag zur Methodik der Anaerobenzüchtung. (Zentralbl. f. Bakt. II. 1929. 77. 551.) Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1929. Bd. 95. S. 40.

64. Wakamatsu. Über die Brauchbarkeit der Fortner'schen Methode für die Kultur der Rauschbrand- und Pararauschbrandbazillen. D.T.W. 1934. Nr. 21. S. 323.

65. Weichardt. Universalapparat für Vakuumverdampfung, Anaerobenzüchtung usw. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1931. Bd. 122. S. 536.

66. Weiss and Czarnetzky. Metall tank for the preparation of mass cultures of anaerobic bakteria. (Amer. J. Publ. Health. 1934. 713—714). Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1934. Bd. 115. S. 538.

67. Zeissler. Apparatur zur Anaerobenzüchtung im luftverdünnten Raum. D.T.W. 1928. S. 494.

68. Zeissler. Anaerobenzüchtung. Handbuch für path. Mikroorganismen von Kolle—Kraus—Uhlenhuth. 3. Aufl. 1930. Bd. X. S. 35.

LEBENSLAUF.

Am 23. August 1907 wurde ich, August Wiedemann, als Sohn des prakt. Tierarztes J. Wiedemann und seiner Ehefrau Franziska Wiedemann, geb. Zech, in Neuburg a. K. Bezirksamt Krumbach geboren. In Burgau besuchte ich die Volksschule. Das humanistische Gymnasium besuchte ich in Neuburg a. D. und Günzburg, wo ich im März 1928 das Reifezeugnis erhielt.

Vom Sommersemester 1928 ab widmete ich mich in München dem Studium der Tierheilkunde und erlangte im Januar 1934 daselbst die Approbation als Tierarzt.

Anschließend war ich in der Praxis tätig. Vom 1. April 1934 an brachte ich 4 Monate im Rahmen des Vorbereitungsdienstes für den Staatsdienst bei dem staatl. Bezirkstierarzt in Wunsiedel zu. Im Monat August 1934 war ich auf Vertretung. Ab 1. September 1934 leistete ich als Praktikant an der Veterinärpolizeilichen Anstalt in Schleißheim meinen staatlichen Vorbereitungsdienst ab. Nebenbei war ich von Oktober bis April 1935 mit der Anfertigung vorliegender Arbeit beschäftigt.